



Description quantitative de la réserve ovarienne par un compte des follicules antraux associé à un dosage de l'hormone antimullerienne dans une population récemment fertile

Solenne Rullan

► To cite this version:

Solenne Rullan. Description quantitative de la réserve ovarienne par un compte des follicules antraux associé à un dosage de l'hormone antimullerienne dans une population récemment fertile. Médecine humaine et pathologie. 2015. dumas-01284147

HAL Id: dumas-01284147

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01284147>

Submitted on 7 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Solenne RULLAN

- Interne des Hôpitaux -

**DESCRIPTION QUANTITATIVE DE LA
RESERVE OVARIENNE PAR UN COMPTE
DES FOLLICULES ANTRAUX ASSOCIE À
UN DOSAGE DE L'HORMONE ANTI-
MULLERIENNE DANS UNE POPULATION
RECEMMENT FERTILE**

Université de Nice Sophia Antipolis
Faculté de Médecine

Nice 2015



**UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS
FACULTE DE MEDECINE**

**DESCRIPTION QUANTITATIVE DE LA RESERVE
OVARIENNE PAR UN COMPTE DES FOLLICULES
ANTRAUX ASSOCIE À UN DOSAGE DE L'HORMONE
ANTI-MULLERIENNE DANS UNE POPULATION
RECEMMENT FERTILE**

THESE

Présentée et soutenue publiquement à la faculté de Médecine de Nice

Le 16 octobre 2014

Par

Solenne RULLAN

Née le 27 octobre 1987 à CHOLET

Interne des hôpitaux de Nice

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

Examineurs de la thèse :

Monsieur le Professeur Patrick FENICHEL
Monsieur le Professeur Pascal STACCINI
Monsieur le Professeur Jérôme DELOTTE
Madame le Docteur Patricia FERRARI
Madame le Docteur Imène FATFOUTA

Président du Juury
Assesseur
Assesseur
Assesseur
Directrice de Thèse

UNIVERSITÉ NICE-SOPHIA ANIPOLIS

FACULTÉ DE MÉDECINE

Liste des professeurs au **1er septembre 2015** à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen	M. BAQUÉ Patrick
Vice-Doyen	M. BOILEAU Pascal
Assesseurs	M. ESNAULT Vincent M. CARLES Michel Mme BREUIL Véronique M. MARTY Pierre
Conservateur de la bibliothèque	Mme DE LEMOS Annelyse
Directrice administrative des services	Mme CALLEA Isabelle
Doyens Honoraires	M. AYRAUD Noël M. RAMPAL Patrick M. BENCHIMOL Daniel

Professeurs Honoraires

M. BALAS Daniel	M. LALANNE Claude-Michel
M. BATT Michel	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BLAIVE Bruno	M. LAZDUNSKI Michel
M. BOQUET Patrice	M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. BOURGEON André	M. LE BAS Pierre
M. BOUTTÉ Patrick	M. LE FICHOUX Yves
M. BRUNETON Jean-Noël	Mme LEBRETON Elisabeth
Mme BUSSIERE Françoise	M. LOUBIERE Robert
M. CAMOUS Jean-Pierre	M. MARIANI Roger
M. CHATEL Marcel	M. MASSEYEFF René
M. COUSSEMENT Alain	M. MATTEI Mathieu
M. DARCOURT Guy	M. MOUIEL Jean
M. DELLAMONICA Pierre	Mme MYQUEL Martine
M. DELMONT Jean	M. OLLIER Amédée
M. DEMARD François	M. ORTONNE Jean-Paul
M. DOLISI Claude	M. SAUTRON Jean Baptiste
M. . FRANCO Alain	M. SCHNEIDER Maurice
M. FREYCHET Pierre	M. SERRES Jean-Jacques
M. GÉRARD Jean-Pierre	M. TOUBOL Jacques
M. GILLET Jean-Yves	M. TRAN Dinh Khiem
M. GRELLIER Patrick	M VAN OBBERGHEN Emmanuel
M. HARTER Michel	M. ZIEGLER Gérard
M. INGLESAKIS Jean-André	

M.C.A. Honoraire

Mlle ALLINE Madeleine

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques
 M. BASTERIS Bernard
 Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie
 Mme DONZEAU Michèle
 M. EMILIOZZI Roméo
 M. FRANKEN Philippe
 M. GASTAUD Marcel
 M. GIRARD-PIPAU Fernand
 M. GIUDICELLI Jean
 M. MAGNÉ Jacques
 Mme MEMRAN Nadine
 M. MENGUAL Raymond
 M. POIRÉE Jean-Claude
 Mme ROURE Marie-Claire

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	AMIEL Jean	Urologie (52.04)
M.	BENCHIMOL Daniel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	DESNUELLE Claude	Biologie Cellulaire (44.03)
Mme	EULLER-ZIEGLER Liana	Rhumatologie (50.01)
M.	FENICHEL Patrick	Biologie du Développement et de la Reproduction (54.05)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GASTAUD Pierre	Ophtalmologie (55.02)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GRIMAUD Dominique	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	PRINGUEY Dominique	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	QUATREHOMME Géraud	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	M.ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	SANTINI Joseph	O.R.L. (55.01)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)

M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
Mme	CRENESSE Dominique	Physiologie (44.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M.	TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

M.	ALBERTINI Marc	Pédiatrie (54.01)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophtalmologie (55.02)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BENIZRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mlle	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CANIVET Bertrand	Médecine Interne (53.01)
M.	CARLES Michel	Anesthésiologie Réanimation (48.01)
M.	CASSUTO Jill-Patrice	Hématologie et Transfusion (47.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M.	DUMONTIER Christian	Chirurgie plastique
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
M.	FREDENRICH Alexandre	Endocrinologie, Diabète et Maladies métaboliques (54.04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Gériatrie (48.04)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE (suite)

M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	JOURDAN Jacques	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
M.	LEVRAUT Jacques	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénéréologie (50.03)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M.	ROGER Pierre-Marie	Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales (45.03)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	VENISSAC Nicolas	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS

M.	HOFLIGER Philippe	Médecine Générale
----	-------------------	-------------------

PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme	LANDI Rebecca	Anglais
Mme	ROSE Patricia	Anglais

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (52.03)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
Mme	LEGROS Laurence	Hématologie et Transfusion (47.01)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
M.	PHILIP Patrick	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
M.	ROUX Christian	Rhumatologie (50.01)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M.	COYNE John	Anatomie et Cytologie (42.03)
M.	GARDON Gilles	Médecine Générale
Mme	PACZESNY Sophie	Hématologie (47.01)
Mme	POURRAT Isabelle	Médecine Générale

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

M	BALDIN Jean-Luc	Médecine Générale
M.	DARMON David	Médecine Générale
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine Générale

PROFESSEURS CONVENTIONNÉS DE L'UNIVERSITÉ

M.	BERTRAND François	Médecine Interne
M.	BROCKER Patrice	Médecine Interne Option Gériatrie
M.	CHEVALLIER Daniel	Urologie
Mme	FOURNIER-MEHOUAS Manuella	Médecine Physique et Réadaptation
M.	JAMBOU Patrick	Coordination prélèvements d'organes
M.	QUARANTA Jean-François	Santé Publique

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury :

A Monsieur le Professeur FENICHEL, président du jury :

Pour m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Merci de m'avoir permis de faire cette si belle spécialité. Vos connaissances sont un exemple pour moi, merci de me les avoir fait partager. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Monsieur le Professeur STACCINI :

Pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Merci pour votre aide si précieuse dans les analyses statistiques de ce travail. C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de juger ce travail. Recevez l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur DELOTTE :

Pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Ta réussite dans tes projets témoigne de ta rigueur et de ta détermination. Merci de m'avoir fait partager tes connaissances en gynécologie. C'est avec plaisir et honneur que je te soumetts ce travail.

A Mme le Docteur FERRARI :

Pour m'avoir fait l'honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Votre gentillesse, votre disponibilité et vos conseils ont été une aide précieuse dans la réalisation de ce travail. Soyez assurée de tout le respect que je vous porte et de ma sincère reconnaissance.

A Madame le Docteur FATFOUTA :

Pour m'avoir fait l'honneur d'être ma directrice de thèse.

Merci d'avoir cru en moi pour la réalisation de ce travail et de m'avoir guidée jusqu'à la réalisation de cet article. Cela a été un plaisir de travailler à tes côtés, sois assurée de tout le respect que je te porte et de ma sincère reconnaissance.

Aux Médecins et Chirurgiens que j'ai côtoyés et qui m'ont tous permis de progresser :

A Monsieur le Professeur BONGAIN,

Je regrette que vous n'ayez pu prendre part au jury de ma thèse.

Je vous remercie de m'avoir soutenu durant toute la réalisation de ce projet et tout au long de mon internat où j'ai beaucoup appris à vos côtés. Votre volonté, votre rigueur et votre savoir sont un exemple pour tous. Je suis honorée d'avoir fait partie de vos élèves pendant ces 4 ans.

A Mme le Docteur HIERONIMUS,

Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'as appris. Ta soif de connaissance et ta rigueur sont pour moi un modèle de travail. Je suis heureuse d'avoir pu travailler à tes côtés.

A Monsieur le Docteur AZUAR,

Mon premier semestre à vos cotés m'a permis d'acquérir des connaissances précieuses pour la suite de mon internat.

A tous les Gynécologues et Chefs de clinique de l'Archet, Cynthia TRASTOUR, Jérôme DELOTTE, Magali HILMI, véronique ISNARD, Maxence DOREZ, Samir BOUKAIDI, Sarah, Lina, Delphine, Mélanie et ... Caro : travailler avec toi c'est tous les jours une aventure ! Mais c'est toujours dans la bonne humeur. Merci également A l'équipe de Grasse : **Dr TIBERGHEN, REBOUL, DE JESUS, ACHOR, VERNIER** où tout a commencé.

A Philippe FOLLANA,

A toutes ces après-midi de consultation en trio ! Merci de m'avoir fait découvrir ta spécialité avec tant de gentillesse et de bonne humeur.

A Dr BRUCKER-DAVIS, Dr SADOUL, Dr CHEVALLIER Nicolas et Madalina

A Dr Daniel MOEGLIN,

Pour m'avoir initié à l'échographie, m'avoir aidé à obtenir le DIU d'échographie et pour croire en moi comme future échographiste.

Aux Equipes Soignantes

De l'HDJ 3 du CAL,

Mention spéciale à **Aurélie** la secrétaire qui est au top !!

D'Endocrinologie,

Alice, Agnès, Solange, Véro, Jean Louis, Sonia, Cathia, Céline x 2, Nathalie, Doriane et Axelle : quelle dynamisme !! Merci pour votre bonne humeur et votre soutien pendant l'année que j'ai partagée avec vous.

De PMA,

Emmanuelle TIBAULT, Stéphanie, Adrien, Cathi, Emeline, Coco, Vava, Laure, Séverine, Hugo, Seb, Mehen, Lolita : 9 mois à vos cotés en PMA ! 9 mois à être chouchoutée !! Merci aux sages femmes pour votre gentillesse et votre soutien dans mes débuts en PMA. A vos cotés tout paraît beaucoup plus facile. Merci à tous les bios pour m'avoir faits découvrir l'autre versant ! Si le GP le J3 et le Blasto n'ont plus de secret pour moi, c'est bien grâce à vous... J'espère vous dire à bientôt.

D'Orthogénie,

Un grand merci à **Yvette** et **Béa** pour m'avoir aidé à recruter mes patientes !!! Un petit clin d'œil également à Annie.

Du bloc Grassois,

Votre gentillesse m'a permis de débiter cette spécialité tout en douceur !!!

Du CPDP,

Dominique, Leila et Amandine : Merci pour votre gentillesse et votre professionnalisme.

Aux Sages femmes de l'Archet,

Bien que l'obstétrique ne soit pas ma destinée, j'ai apprécié découvrir cette spécialité avec vous. Je garde de la salle de naissance un très bon souvenir et c'est certainement grâce à vous. Merci également à **Charlotte, Ségo et Claire** de votre aide pour le DIU d'échographie.

Aux Secrétaires du service de Gynécologie de l'Archet,

Merci pour votre écoute et votre sympathie.

Aux techniciens préleveurs du centre de biologie de l'Archet et au personnel technique du laboratoire d'Hormonologie,

Merci de d'avoir accepté ce surcroît de travail et de m'avoir permis la réalisation de ce travail.

A mes Co-Internes

Krykry,

C'est qui le Dr DROMER ! C'est moi patate ! J'ai été heureuse d'avoir été ta co-interne pendant ces 3 mois ! Mais ça c'était il y à longtemps ... Maintenant je suis heureuse de pouvoir partager toutes tes péripéties !!!

Juliette,

Ma Juju, tu étais là pour ma 1^{ère} au cafoutche ! Il à fallu attendre quasi 2 ans avant de se retrouver ! Je pense que si j'ai survécu au CAL, c'est grâce à toi !!! C'est top d'être ta co interne mais c'est encore mieux d'être ton amie !

Constance,

Les 2 blondes à grasse ! J'ai kiffer débiter la gynéco à tes cotés !

Sandrine et Christine,

Mes 2 petits rayons de soleil pendant ce 1^{er} semestre au CHU !!

Jo,

Merci pour ta gentillesse. Avec toi en PMA ce fut 6 mois de stage de rêve !

Au GM : Cha P, Chacha, Clélia, Sarah et Audrey,

Au plaisir de vous revoir !

A toutes les GO : Tatiana, Charline, Marine, Fanny, Chris, Elo, Julie, Laurence, Sam, Juju, Vincent, Louise,

Merci de m'avoir accueillis parmi les vôtres pendant tout ces semestres !!!

Aux anciens de l'archet : Adeline, Audrey, Beutcha, Caro, Chloé, Céline et à tous les autres !

Ce fut un plaisir de partager cet internat avec vous !!

A Berneu et Claire,

Merci pour votre sympathie et votre gentillesse !

A mes Amis,

Loulou,

A Rognes, A Lambesc, A Aix, A la Gym, on à presque grandi comme des sœurs ! Merci pour tous ces moments partagés.

Ann Ju,

A toutes nos péripéties ! Les moments avec toi c'est toujours une aventure ! A quand les prochaines ??

Maud,

D'abord voisine d'internat puis voisine à Nice ! Depuis 3 ans on ne se quitte plus !!! Merci de m'avoir soutenu pendant tout mon internat ! Un petit clin d'œil à Nico également !

Stouf et karine,

Mes 2 compatriotes d'externat ! Je suis heureuse de vous voir enfin sur Nice !

Clem, Mimi, Cess, Caro, Zizou, Claire, Anne-lise

Au souvenir de toutes ces heures d'entraînements, de tous ces trajets en mini bus, de tous ces fou rires ! Ce sera toujours un plaisir de vous revoir ! A quand le prochain entraînement sénior ?? La bise à **Lucie et André**

A Yoyoo, So, Mikashu, Simon, Alex, Cyril, Juju, Lilou, Jim et Matthieu

Pour tous ces bons moments partagés au lycée et après !

A ma Famille,

A ma Mère,

Merci de m'avoir toujours suivie et soutenue dans tous mes projets, tu en as tellement fait pour moi. Je ne te remercierai jamais assez.

A mon Père,

Je sais que je pourrais toujours compter sur toi. Merci pour tous les bons moments que l'on a partagés.

A mes Sœurs et mon frère : Soizic, Lulu et Clémence

Vous avoir à mes côtés est une chance !

A mes Grands Parents Maternels,

Merci d'être présents aujourd'hui.

A ma Grand Mère Paternelle,

Je te dois beaucoup de ma réussite en 1ère année de médecine.

A la mémoire de mon grand père paternel,

A Sophie, Frank et à ma belle famille,

A Maxime,

Merci de prendre soin de moi et de m'aimer comme tu le fais.

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	p13
------------------------------------	------------

INTRODUCTION.....	p7
--------------------------	-----------

1) Généralités : ovaires et réserve ovarienne.....	p15
2) CFA.....	p18
3) AMH.....	p19
4) Intérêt de l'étude	p20
5) Objectif de l'étude.....	p21

NOTRE ETUDE.....	p22
-------------------------	------------

1) Matériel et méthode	p23
a. Echographie	p23
b. AMH	p24
c. Analyses statistiques	p24
2) Résultats	p25
3) Discussion	p31
4) Conclusion	p35

ARTICLE.....	p36
---------------------	------------

ANNEXES	p50
----------------------	------------

1) Consentement.....	p51
2) Questionnaire	p52
3) AnshLabs	p54

BIBLIOGRAPHIE	p60
----------------------------	------------

SERMENT D'HIPPOCRATE	p67
-----------------------------------	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

CFA : Compte des follicules antraux

AMH : Hormone anti-müllérienne

RO : réserve ovarienne

AMP : Assistance médicale à la procréation

FIV : Fécondation in vitro

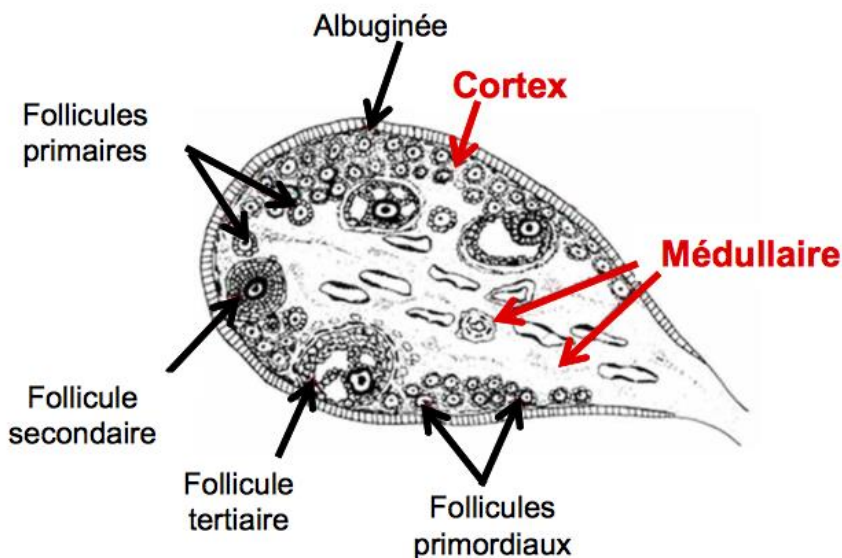
IMC : Indice de masse corporelle

IVG : Interruption volontaire de grossesse

INTRODUCTION

1) Généralités : Ovaire et réserve ovarienne

L'ovaire comprend deux régions histologiques ; la médullaire centrale et le cortex. Le cortex renferme les follicules séparés les uns des autres par du tissu conjonctif et des vaisseaux sanguins. Il est le siège de l'activité folliculaire (1). La médullaire contient du tissu conjonctif et le hile formé des nerfs, vaisseaux et lymphatiques.

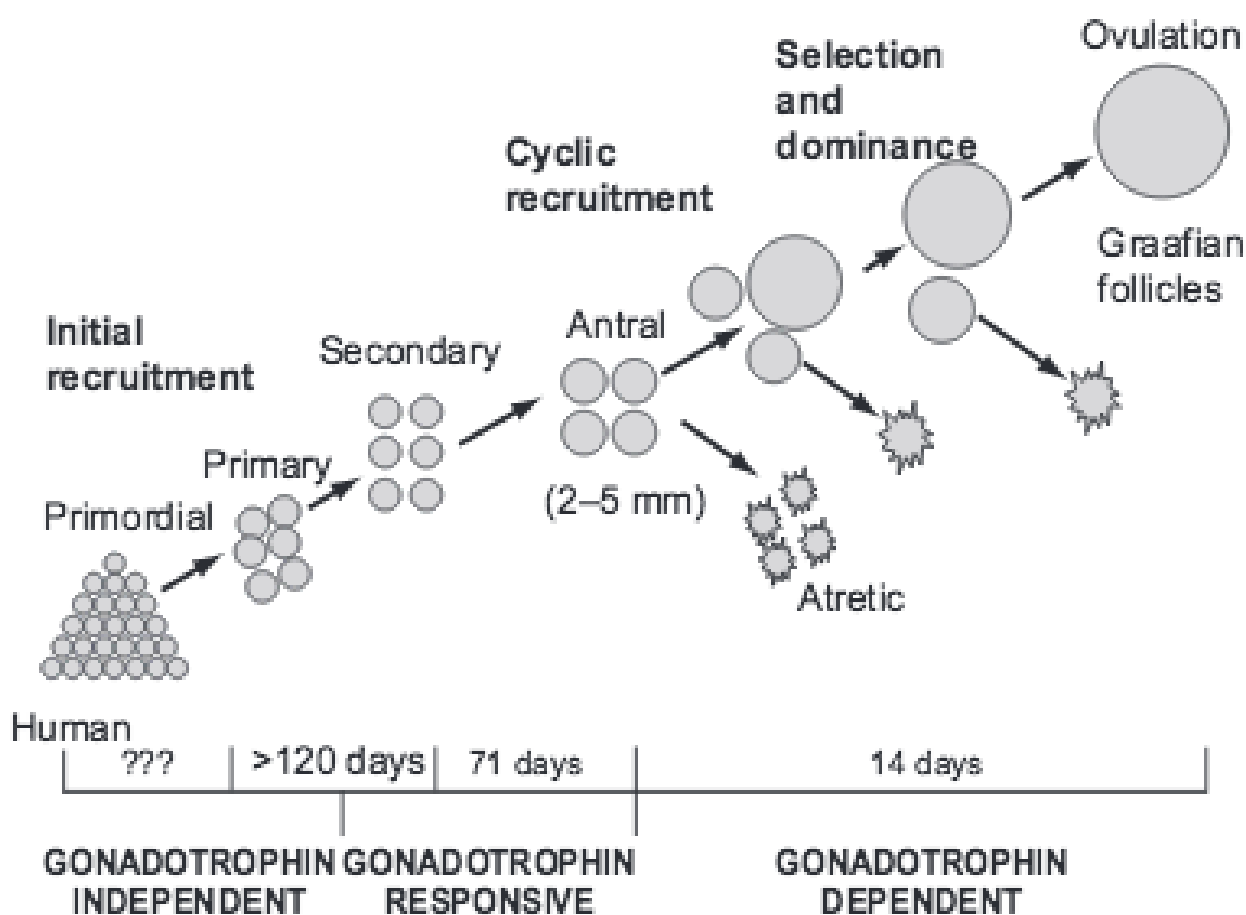


L'ovaire a une double fonction : une fonction gamétogénèse, puisqu'il assure la croissance, la maturation puis l'émission du gamète femelle : l'ovocyte ; et une fonction endocrinienne puisqu'il synthétise les hormones stéroïdiennes. C'est à partir de la puberté et jusqu'à la ménopause que l'ovaire assure cette double fonction.

Les cellules germinales ; ovocytes sont entourés de cellules de soutien appelées cellules folliculaires. La cellule germinale et les cellules folliculaires forment les follicules ovariens primordiaux. Ils commencent à se former au cours du 4^{ème} mois de grossesse. Le pool maximal de follicules primordiaux est obtenu vers le 8^{ème} mois de gestation (2). Il constitue la réserve ovarienne (RO) non renouvelable de la femme. Ce pool folliculaire ne cessera par la suite de diminuer de façon progressive. A la naissance on l'estime à 1 million ; il serait d'environ 400 000 à la puberté, de 25 000

à 37 ans, de 10 000 à 40 ans et moins de 1000 à la ménopause (3). La déplétion folliculaire est liée en majeure partie à l'évolution naturelle des follicules vers l'atrésie et en moindre mesure au recrutement folliculaire et à leur entrée en folliculogénèse.

La folliculogénèse est un ensemble de processus au cours duquel un follicule primordial se développe pour atteindre l'ovulation (moins de 0,1%) ou régresse par apoptose (99,9%) (4). Ainsi on distingue les follicules primordiaux qui constituent le pool de réserve et les follicules entrés en folliculogénèse. Parmi eux on distingue les follicules primaires, secondaires, antraux, de De Graaf et atrétiques.



Broekmans. Standardization of AFC in ART. Fertil Steril 2010.

Le déclin de la fonction reproductive de la femme est directement lié à son âge en raison d'une réduction du pool des follicules primordiaux et de la qualité ovocytaire (5). L'évaluation de la RO a donc tout son intérêt dans la population infertile. Outre l'âge maternel, plusieurs marqueurs biologiques et échographiques ont été étudiés pour objectiver une baisse de la réserve ovarienne (6). La majorité des études évaluant ces marqueurs ont été réalisées dans la population infertile. Parmi les plus utilisés, on peut citer :

La FSH ; son élévation prématurée au cours de cycle semble être un bon reflet du vieillissement ovarien (7). Une diminution des chances de grossesse spontanée est observée quand son taux dépasse 8 UI/L (8). Sa variabilité inter-cycle est importante (9) et sa valeur prédictive pour les mauvaises répondeuses à la stimulation ovarienne est faible sauf dans les cas extrêmes (10). La FSH ne permet donc pas de détecter des baisses débutantes de la RO.

L'estradiol ; Sa capacité à prédire les mauvaises répondeuses et les chances de grossesse en FIV est très faible (10). Il ne permet pas d'évaluer la RO.

L'inhibine B ; ne semble pas être pertinent pour évaluer la RO ni prédire les chances de grossesse (10). De plus, il existe une grande variabilité intra-cycle de l'inhibine B, son dosage doit se faire à un instant précis du cycle difficilement réalisable en pratique.

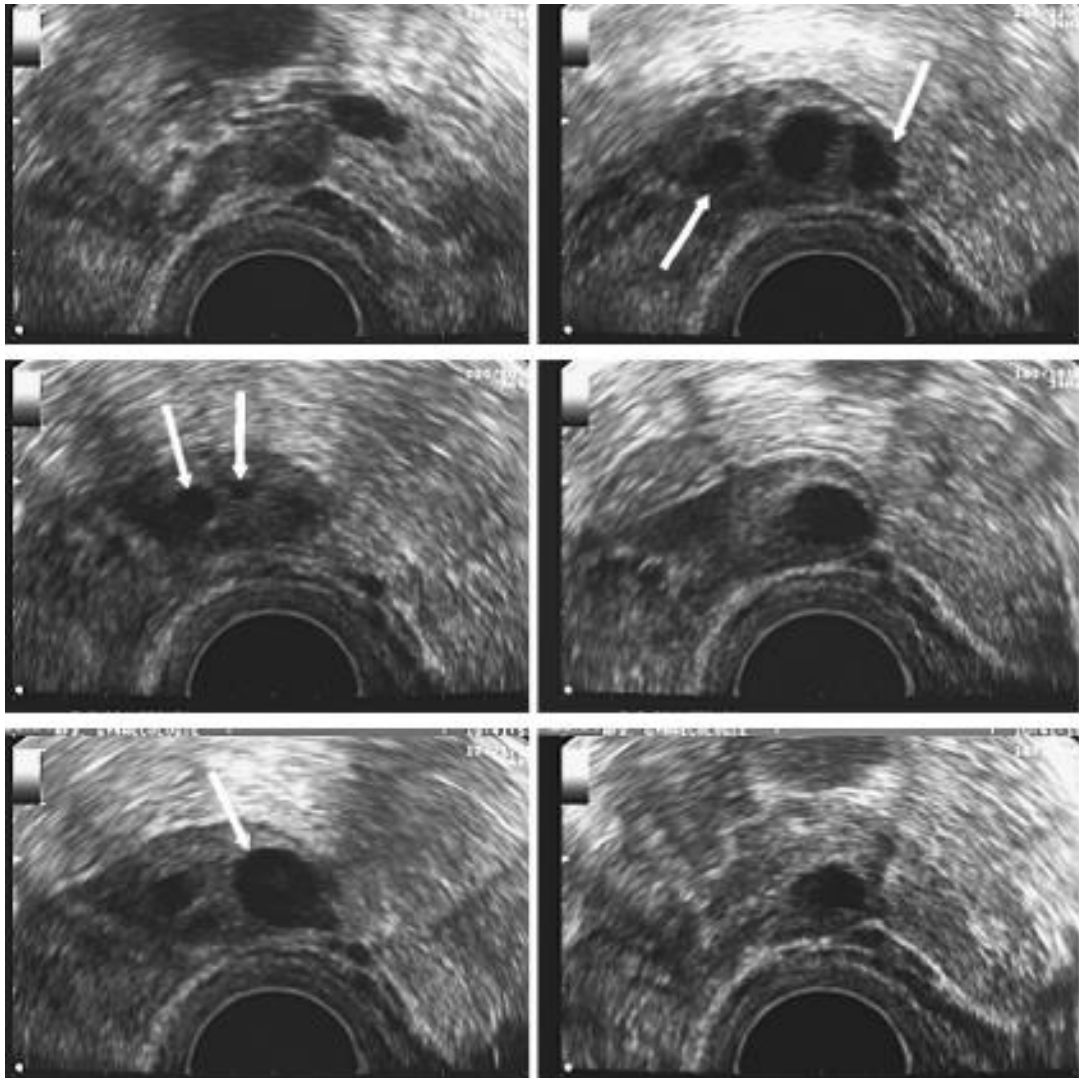
L'hormone anti-Müllérienne (AMH) semble être un bon marqueur pour repérer une baisse débutante de la RO (11) et **le Compte des follicules antraux (CFA)** semble bien corrélé au nombre de follicules primordiaux et donc à la RO restante (12).

Il a été démontré que le **CFA** et l'**AMH** sont de bons marqueurs pour prédire la réponse à la stimulation ovarienne et prédire le nombre d'ovocytes recueillis sans pour autant prédire les chances de grossesse et de naissance après fécondation in vitro (FIV) (10,13). Dans ce but, ils ont démontré leur supériorité vis-à-vis des autres marqueurs (14,15) et sont actuellement incontournables pour évaluer la RO avant prise en charge en PMA.

2) Le Compte des follicules antraux (CFA)

Il s'agit d'un décompte échographique des follicules antraux mesurant entre 2 et 9 mm visibles en échographie endovaginale. Leur nombre entre J2 et J5 diminue avec l'avancement de l'âge et semble bien corrélé au nombre de follicules primordiaux restants (12,16,17).

Il est admis, bien que non prouvé, que le CFA reflète le pool des follicules primordiaux restants. En 2010 Broekmans publie des recommandations sur la réalisation du CFA afin d'améliorer la pertinence de cet examen dans la pratique clinique et dans les futurs essais cliniques (18).



Le CFA est actuellement un test de routine utilisé pour l'exploration de la RO d'une femme avant prise en charge en AMP. Il est considéré comme un marqueur quantitatif de la RO (5). Il a été largement étudié dans le cadre de l'infertilité où il apparaît être un bon prédicteur du nombre d'ovocytes recueillis mais aussi des mauvaises répondeuses après stimulation ovarienne sans être prédictif sur les taux de grossesse et de naissance en AMP (13,19,20).

C'est un examen peu coûteux relativement stable entre les cycles et au cours d'un même cycle (21). La répétition de sa mesure n'augmente pas sa valeur prédictive en AMP (22). Il existe une variation opérateur dépendant surtout pour les CFA élevés qui reste cependant modérée (23). L'étude du CFA peut se faire en imagerie 2 ou 3D. Actuellement les 2 techniques sont en adéquation en terme de reproductibilité inter et intra observateur (24,25). Cependant, comme tout examen échographique, le CFA reste dépendant de l'échographiste mais également de l'échographe.

3) L'hormone anti-Müllérienne (AMH)

L'AMH est une glycoprotéine dimérique de 140 kDA dont les deux chaînes sont reliées par des ponts disulfure. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur, la pré pro AMH, qui est ensuite clivée par protéolyse près de l'extrémité C-terminale. C'est le fragment C-terminal de 25 kD issu du clivage qui est biologiquement actif. Le fragment N-terminal potentialise l'activité biologique du fragment C-terminal. L'AMH fait partie de la super famille des « transforming growth factor beta » (TGF β). Chez le fœtus féminin, l'AMH n'est sécrétée qu'après la 36^{ème} semaine de grossesse. En effet, c'est son absence en début de grossesse qui permet le maintien des canaux de Müller qui donneront naissance à l'utérus, aux trompes et au 2/3 supérieur du vagin. Elle est sécrétée par les cellules de la granulosa des follicules primaires, secondaires, pré-antraux et des petits follicules antraux. Les follicules primordiaux, dominants et atériques, quant à eux, ne semblent pas sécréter d'AMH (26). Ainsi,

l'AMH est sécrétée dès lors que le recrutement folliculaire a eu lieu et ce jusqu'au stade où les follicules deviennent sélectionnables (27).

L'AMH est actuellement utilisée en pratique clinique dans l'infertilité mais a également un intérêt dans le domaine carcinologique où elle est un marqueur intéressant des tumeurs ovariennes de la granulosa. Son dosage avant et après traitement chirurgical permet de confirmer l'exérèse complète ou non de la tumeur (28). Elle est également utilisée pour évaluer la RO des patientes avant et après traitement anticancéreux et ainsi déterminer l'effet du traitement sur la fertilité (29).

Dans le cadre de l'infertilité, l'AMH est couramment dosée afin d'évaluer la RO. Elle est considérée comme un marqueur quantitatif de la RO (30,31). Elle apparaît être un bon marqueur pour prédire la réponse à la stimulation et prédire le nombre d'ovocytes recueillis sans pour autant prédire les chances de grossesse. (32). Son taux diminue avec l'avancement de l'âge de la femme (11,33) et la majorité des études ont montré qu'elle était stable tout au long du cycle et entre les cycles (34,35).

4) Intérêts de l'étude

Le CFA et l'AMH ont donc largement été étudiés dans le cadre de l'infertilité où ils ont démontré leur supériorité pour dépister les baisses précoces de RO et pour prédire la réponse à la stimulation ovarienne en FIV. En revanche ils ont très peu été étudiés dans la population générale et dans la population fertile.

Une étude en 2011 rapportait les valeurs du CFA au cours de la vie reproductive. Il s'agissait du premier document rapportant les valeurs dites normales du CFA en fonction de l'âge dans la population générale (17). Mais à notre connaissance aucune étude n'a été faite dans une population récemment fertile. De plus l'amélioration des images en échographie pourrait nous inciter à revoir nos valeurs de référence.

En ce qui concerne l'AMH, ses valeurs normatives sur un groupe de patientes récemment fertiles ont été publiées en 2011 pour la trousse GEN II Beckman (36). Mais plusieurs trousse de dosage sont actuellement commercialisées, et pour une même patiente les résultats peuvent varier (37,38). Devant ces divergences dans les résultats parfois contraire aux indications fournies par les fabricants, une étude récente a incité à la prudence dans l'interprétation des taux d'AMH en pratique clinique (39). L'établissement de normes pour chaque trousse semble donc important pour une bonne interprétation des résultats d'AMH.

Notre centre utilisait la trousse GEN II Beckman depuis 2010 et pour laquelle des normes avaient été établies en 2011, mais des dérives dans les résultats ont été constatées début 2013 avec cette trousse. Celles-ci seraient probablement dues à un changement des réactifs. En août 2014 nous avons donc changé de trousse d'AMH au profit du kit UltraSensitive AMH / MIS ELISA d'Anhlabs, Webster, USA utilisé en France depuis fin 2013 et pour lequel nous n'avons pas encore établi de valeurs de référence.

5) Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude est de décrire l'aspect de la RO par un compte des follicules antraux et un dosage d'AMH avec la trousse UltraSensitive AMH / MIS ELISA dans une population de femmes récemment fertiles afin de fournir des valeurs de référence.

NOTRE ETUDE

1) Matériel et méthode

Nous avons mené une étude observationnelle sur une cohorte de patientes ayant fait preuve d'une fertilité récente de moins de 4 mois et venant de réaliser une interruption volontaire de grossesse autorisée en France jusqu'à 14 semaines d'aménorrhée. Les données ont été collectées entre août 2014 et janvier 2015 dans le service d'orthogénie du pôle de gynécologie obstétrique et reproduction du CHU de Nice, France. Etaient éligibles toutes les patientes majeures se présentant à leur consultation de contrôle prévue de façon systématique quinze jours après réalisation d'une interruption volontaire de grossesse (IVG) médicale ou chirurgicale et pendant laquelle une échographie endovaginale était réalisée. Au cours de cette consultation, la participation à l'étude était proposée à toutes les patientes par le médecin investigateur et après explication sur le déroulement de l'étude, un consentement était signé. Pour les patientes acceptant de participer à l'étude, étaient notifiées dans un questionnaire standardisé les informations telles que : l'ethnie, les antécédents médicaux et chirurgicaux, la présence d'un tabagisme actif ou non, la taille, le poids, la gestité et la régularité des cycles. L'hyperandrogénie clinique définie par la présence d'un hirsutisme associé ou non à une acnée était également recherchée. L'échographie de vacuité utérine était complétée par la réalisation d'un compte des follicules antraux. Les patientes présentant un kyste ovarien, un follicule ou un corps jaune supérieur à 10 mm n'ont pas été incluses ainsi que celles dont au moins un des ovaires n'était pas vu. A l'issue de la consultation, le dosage d'AMH pratiqué pendant le bilan pré- opératoire était récupéré et noté dans le questionnaire.

Echographie

L'échographie était réalisée par voie endovaginale avec une sonde RIC 5-9 Mhz sur un Voluson 730 expert (Général Electric Systems, France). L'examen du CFA était fait par un balayage échographique du pôle supérieur au pôle inférieur de l'ovaire droit et gauche répété 2 fois. Le ou les plus gros follicules étaient mesurés par 2 diamètres et si un follicule était > 10 mm, la patiente était alors exclue

de l'étude. Toutes les données recueillies ainsi que toutes les échographies étaient réalisées par le médecin investigateur.

AMH

Le dosage de l'AMH était toujours réalisé au centre d'hormonologie du CHU de Nice avec la trousse UltraSensitive AMH / MIS ELISA d'Anshlabs, Webster, USA utilisée en France depuis fin 2013. Les échantillons après conservation à -20°C étaient analysés lors des dosages de routine effectués au laboratoire une fois par semaine. Cette trousse est utilisée dans notre centre depuis Août 2014. La trousse UltraSensitive AMH / MIS est un test d'immuno-essai quantitatif de type sandwich en 3 étapes utilisant des anticorps monoclonaux. La prise d'essai est de 25 µl, le dosage est réalisé en double détermination. Le coefficient de variance (CV) intra-série est de 4% et inter-série de 1,98% pour une valeur de 1,85 ng/ml. La quantité minimale d'AMH/MIS détectable dans un échantillon avec probabilité de 95% est 0,023 ng/ml. La limite de quantification estimée à une précision de 20% est de 0,06 ng/ml. La limite de détection est de 0,10 ng/ml.

Analyses statistiques

L'analyse des variables qualitatives a été exprimée en fréquences et pourcentages. L'analyse des variables quantitatives a été exprimée en moyenne \pm écart-type. Compte tenu des effectifs par strate, souvent inférieurs à 30, la médiane et l'intervalle interquartile ont été calculés également. La recherche d'une association entre deux variables qualitatives (classe d'âge, classe de BMI, tabac) a été réalisée avec le test du Chi2. La recherche d'une association entre deux variables quantitatives (CFA, AMH) a utilisé le coefficient de corrélation de Pearson. Les valeurs d'AMH ont été transformées en valeurs logarithmiques pour la réalisation des tests.

Un modèle de régression linéaire simple a été utilisé pour identifier deux à deux les liens entre les classes d'âge, les classes de BMI, le tabac, la valeur du CFA et la valeur d'AMH (calcul du coefficient de Pearson). Tous les tests statistiques ont utilisé un risque alpha fixé a priori à 0,05.

2) Résultats :

Au total 152 patientes ont été vues dans le cadre de cette étude. Après réalisation de l'échographie, 36 d'entre elles n'ont pas été incluses. Une cohorte de 116 patientes a finalement été sélectionnée pour nos analyses statistiques. Aucune patiente n'avait d'antécédents gonado-toxiques, deux patientes avaient eu une ovariectomie unilatérale dont la cause n'était pas connue. L'âge médian de notre population était de 25 ans [18 - 43], l'IMC médian à 21,8 [17,5 - 38,1], 13,8% des patientes étaient en surpoids et 6,0% présentaient une obésité. 49% des patientes étaient fumeuses. La gestité médiane était de 2 et augmentait avec l'âge. 95 patientes (82%) avaient des cycles réguliers entre 27 et 35 jours. Parmi les 21 patientes qui présentaient des cycles irréguliers, 4 présentaient une spanioménorrhée et 2 de ces patientes présentaient des signes d'hyperandrogénie sans surpoids associé. Les caractéristiques démographiques de notre cohorte par tranche d'âge sont reportées dans le **Tableau I (annexe I)**.

La médiane du CFA était de 23 [1 - 82] avec un 25^{ème} et 75^{ème} percentile à 14,75 et 35 ; le taux médian d'AMH de 2,64 ng/ml [0,14 – 12,2] et les 25^{ème} et 75^{ème} percentiles étaient de 1,84 ng/ml et 4,14 ng/ml. Ces résultats sont reportés dans le **Tableau II (annexe I)** pour la population totale et par sous groupe d'âge. La médiane, les interquartiles, les plus hautes et plus basses valeurs du CFA sont illustrés dans la **figure 1** et de la concentration d'AMH dans la **figure 2**. La comparaison des groupes met en évidence une concentration élevée d'AMH associée à un CFA élevé avant l'âge de 30 ans avec une médiane de 3,04 pour le taux d'AMH et de 28 pour le CFA alors qu'après 30 ans la médiane se situe à 1,83 pour le taux d'AMH et à 13 pour le CFA. Cette différence est significative avec un $p < 0,001$.

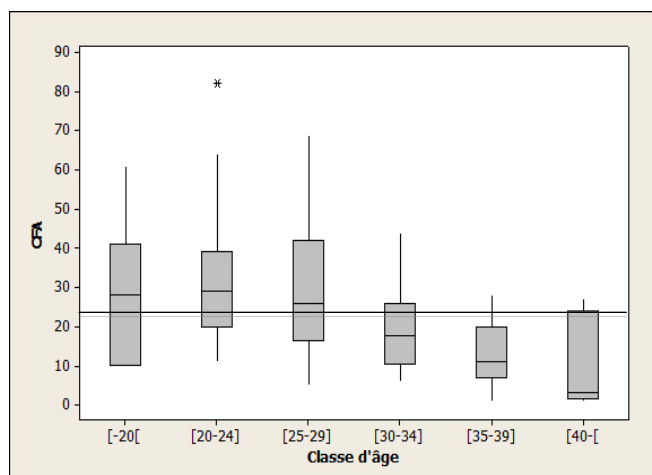
Figure 1

Figure 1 : valeurs du CFA par tranche d'âge : < 20 ans (n=11) ; de 20 à 24 ans (n=43) ; de 25 à 29 ans (n=29) ; de 30 à 34 ans (n=16) ; de 35 à 39 ans (n=12) et \geq 40 ans (n=5). Dans chaque boîte la ligne horizontale représente la médiane, la boîte représente les limites du 25^{ème} au 75^{ème} percentile et le trait vertical les plus hautes et basses valeurs.

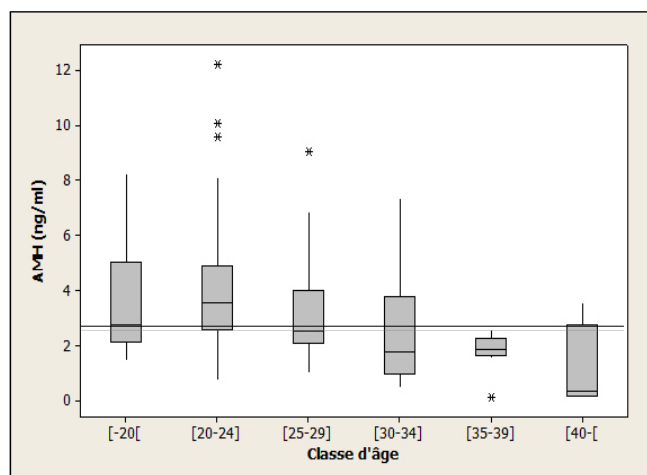
Figure 2

Figure 2 : valeurs de la concentration d'AMH par tranche d'âge : < 20 ans (n=11) ; de 20 à 24 ans (n=43) ; de 25 à 29 ans (n=29) ; de 30 à 34 ans (n=16) ; de 35 à 39 ans (n=12) et \geq 40 ans (n=5). Dans chaque boîte la ligne horizontale représente la médiane, la boîte représente les limites du 25^{ème} au 75^{ème} percentile et le trait vertical les plus hautes et basses valeurs.

Les variables âge, tabac et classe de IMC (< 18.5; 18,5-24,9; 25-29,9; >30) ont été étudiées comme facteur de variation du CFA et de l'AMH. Il n'a pas été retrouvé de lien significatif entre ces trois variables qui apparaissent dans notre étude comme indépendantes l'une de l'autre. Le modèle de régression général a mis en évidence une association statistiquement significative uniquement pour la variable âge avec $p < 0,001$ pour le CFA et $p = 0,003$ pour l'AMH avec une intensité modérée comme en témoigne l'indice de Pearson à -0,45 pour le CFA et -0,41 pour l'AMH. Les associations tabac et CFA ou tabac et AMH ne sont pas significatives avec $p = 0,47$ pour le CFA et $p = 0,80$ pour l'AMH. Concernant l'association classe de BMI et CFA, on note une association qui s'approche de la significativité sans toutefois l'atteindre avec un $p = 0,09$ et l'absence de lien significatif entre classe de BMI et AMH avec $p = 0,24$. La relation significative qui existe entre l'âge et nos marqueurs est illustrée

par les **figures 3, 4 et 5**. On remarque une diminution linéaire du CFA et de l'AMH avec l'augmentation de l'âge de la patiente.

Figure 3

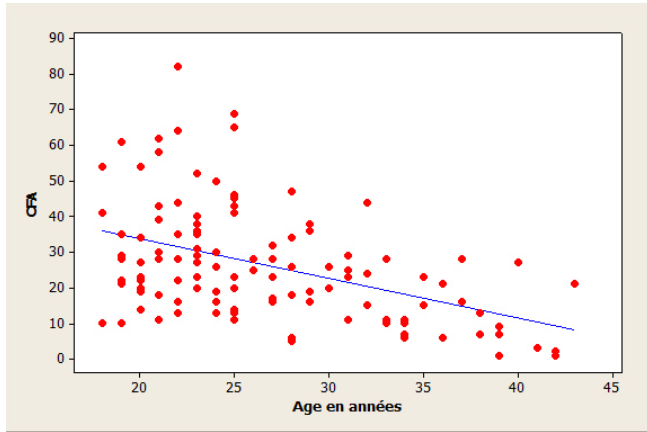


Figure 3 : relation entre l'âge et le CFA. Il existe une corrélation négative significative entre l'âge et le CFA avec un coefficient de Pearson= 0,45

Figure 4

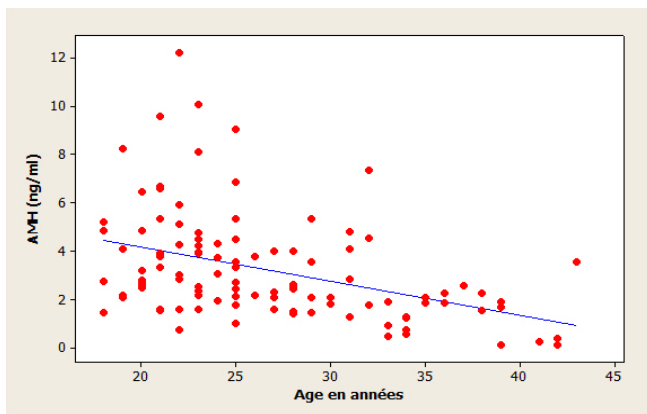


Figure 5

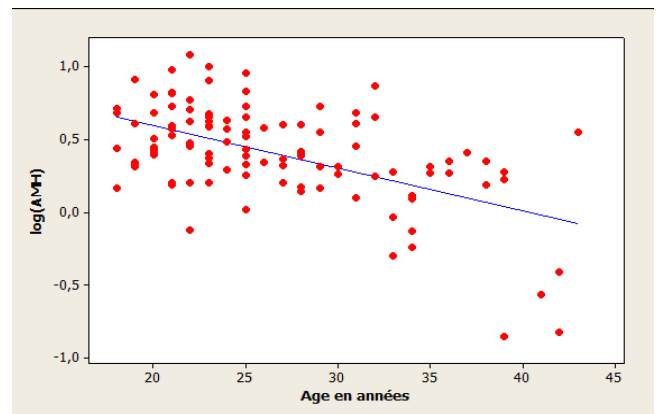


Figure 4 et 5: relation entre l'âge et le taux d'AMH. Il existe une corrélation négative significative entre l'âge et le taux d'AMH avec un coefficient de Pearson= 0,41 ($p=0,0001$) et de 0,752 ($p< 0,001$) pour les valeurs d'AMH exprimées en \log_{10}

ANNEXE I.

tableau I : Caractéristiques démographiques

classe d'âge (années)	AGE en années	BMI, Kg/m ²					TABAC		GESTITE	CYCLES	
	Moyenne ± écart type (min-max) + [Médiane]	< 18,5	18,5-24,9	25-29,9	≥ 30	Moyenne ± écart type (min-max) + [Médiane]	oui	non	Médiane (min-max)	réguliers	irréguliers
< 20 (n=11; 9,5%)	19 ± 1 (18-19) [19]	1	7	2	1	22,3 ± 4,1 (18,4-31,6) [20,3]	6	5	1,0 (1-1)	10	1
20 - 24 (n=43; 37,1%)	22 ± 1 (20-24) [22]	7	32	4	0	21,3 ± 2,7 (17,5-27,3) [21,1]	20	23	1,0 (1-5)	33	10
25 - 29 (n=29; 25,0%)	27 ± 2 (25-29) [27]	1	18	6	4	24,3 ± 5,2 (17,5-38,1) [22,2]	13	16	2,0 (1-6)	23	6
30 - 34 (n=16; 13,8%)	32 ± 1 (30-34) [32]	1	15	0	0	20,8 ± 1,7 (17,6-24,8) [20,5]	10	6	4,0 (1-6)	15	1
35 - 39 (n=12; 10,3%)	37 ± 2 (35-39) [37,5]	1	6	3	2	24,9 ± 4,2 (18,0-32,4) [24,5]	7	5	4,5 (2-9)	11	1
≥ 40 (n=5; 4,3%)	42 ± 1 (40-43) [42]	0	4	1	0	22,2 ± 2,1 (19,8-25,5) [21,8]	1	4	3,0 (2-7)	3	2
TOTAL (n=116; 100%)	27 ± 7 (18-43) [25]	11 9,50%	82 70,70%	16 13,80%	7 6,00%	22,5 ± 3,9 (17,5-38,1) [21,8]	57 49%	59 51%	2,0 (1-9)	95 81,90%	21 18,10%

Tableau II : Distribution de la concentration d'AMH et du CFA

Classe d'âge (années)	CFA					AMH				
	Moyenne ± écart type (min-max)	Percentiles			EIQ	Moyenne ± écart type (min-max)	percentiles			EIQ
		25	50	75			25	50	75	
< 20 (n=11; 9,5%)	29,2 ± 17,4 (10-61)	10	28	41	31	3,68 ± 2,16 (1,47-8,23)	2,12	2,78	5,03	2,91
20 - 24 (n=43; 37,1%)	32,1 ± 15,7 (11-82)	20	29	39	19	4,13 ± 2,43 (0,76-12,2)	2,57	3,55	4,92	2,35
25 - 29 (n=29; 25,0%)	29,3 ± 16,2 (5-69)	16,5	26	42	25,5	3,18 ± 1,82 (1,04-9,06)	2,07	2,53	4,02	1,95
30 - 34 (n=16; 13,8%)	18,7 ± 10,4 (6-44)	10,2	17,5	25,7	15,5	2,36 ± 1,91 (0,50-7,35)	1	1,79	3,79	2,79
35 - 39 (n=12; 10,3%)	12,9 ± 8,0 (1-28)	7	11	19,25	12,7	1,81 ± 0,66 (0,14-2,57)	1,64	1,88	2,25	0,6
≥ 40 (n=5; 4,3%)	10,8 ± 12,3 (1-27)	1,5	3	24	22,5	1,09 ± 1,65 (0,15-3,56)	0,18	0,33	2,77	2,59
TOTAL (n=116)	26,4 ± 16,1 (1-82)	14,2	23	35	20,8	3,26 ± 2,20 (0,14-12,2)	1,83	2,64	4,2	2,37
intervalle de confiance	[23,4 - 29,3]	[20,9 - 28]			[14,2 - 18,4]	[2,8 - 3,7]			[2,3 - 3,1]	[1,9 - 2,5]

Concernant les classes de IMC, on remarque une tendance à la diminution du CFA et du taux d'AMH avec l'augmentation du IMC et ceci dans des groupes où l'âge médian est toujours inférieur à 30 ans. Cette association est non significative mais s'en approche concernant l'association classe de BMI et CFA. Ces résultats sont illustrés par les **figures 6 et 7**

Figure 6

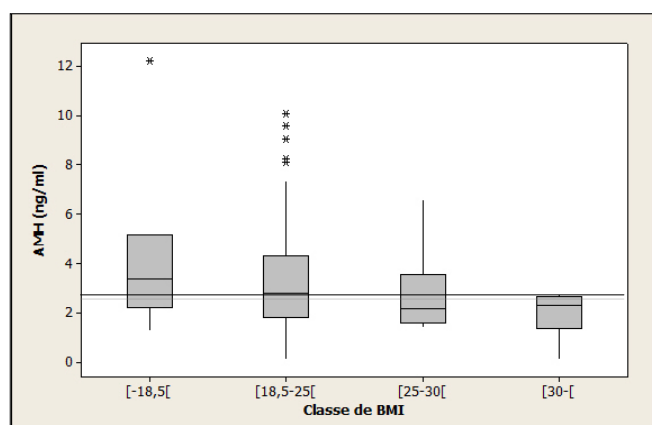


Figure 6 : Relation du CFA en fonction des classes d'IMC. ($p=0,09$). $< 18,5$ ($n=11$) ; $18,5-24,9$ ($n=82$) ; $25-29,9$ ($n=16$) ; ≥ 30 ($n=7$). Dans chaque boîte la ligne horizontale représente la médiane, la boîte représente les limites du 25^{ème} au 75^{ème} percentile et le trait vertical les plus hautes et basses valeurs.

Figure 7

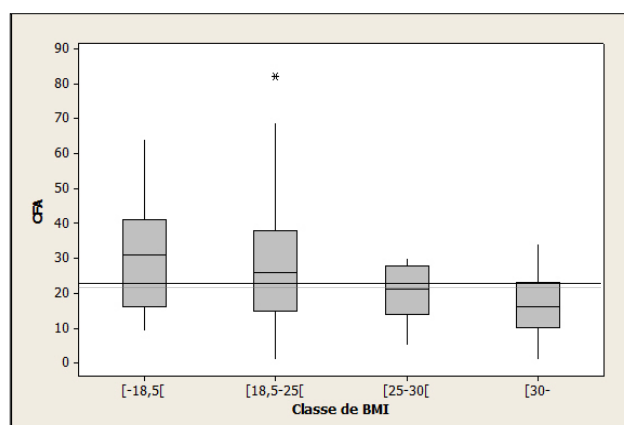


Figure 7 : Relation du taux d'AMH en fonction des classes d'IMC. ($p=0,24$). $< 18,5$ ($n=11$) ; $18,5-24,9$ ($n=82$) ; $25-29,9$ ($n=16$) ; ≥ 30 ($n=7$). Dans chaque boîte la ligne horizontale représente la médiane, la boîte représente les limites du 25^{ème} au 75^{ème} percentile et le trait vertical les plus hautes et basses valeurs.

Concernant le tabagisme, il n'est pas retrouvé de différence de CFA et du taux d'AMH entre les patientes fumeuses et non fumeuses, avec un CFA médian à 25 chez les fumeuses vs 23 chez les non fumeuses et un taux d'AMH à 2,78 vs 2,64. L'âge médian était de 25 ans dans les 2 sous-groupes. Les valeurs moyennes avec écart type et les médianes du CFA et du taux d'AMH en fonction des classes de BMI et du tabagisme des patientes sont reportées dans le **Tableau III**.

Tableau III : variation du CFA et de l'AMH en fonction du BMI du tabagisme

classe de BMI	Age médian (min-max)	Tabagisme actif	CFA Moyen \pm écart type	CFA médian (min-max)	EIQ	AMH Moyen \pm écart type	AMH médian (min-max)	EIQ
< 18,5 n=11	22 (18-39)	6 (54,5%)	29,9 \pm 16,7	31 (9-64)	25	4,21 \pm 3,130	3,39 (1,31-12,20)	2,93
18,5-24,9 n=82	25 (18-43)	42 (51,2%)	28,0 \pm 17,1	26 (1-82)	23,2	3,33 \pm 2,20	2,82 (0,15-10,09)	2,51
25-29,9 n=16	26 (19-40)	4 (25%)	19,9 \pm 8,05	21 (5-30)	14	2,72 \pm 1,46	2,2 (1,40-6,58)	2
≥ 30 n=7	28 (18-39)	4 (57,1%)	16,6 \pm 10,3	16 (1-34)	13	2,00 \pm 0,98	2,31 (0,14-2,78)	1,29
tabagisme actif	Age médian (min-max)	BMI médian	CFA Moyen \pm écart type	CFA médian (min-max)	EIQ	AMH Moyen \pm écart type	AMH médian (min-max)	EIQ
OUI n=57	25 (18-43)	21,2	27,3 \pm 14,9	25 (1-65)	22,5	3,19 \pm 1,83	2,78 (0,14-9,06)	2,37
NON n=59	25 (18-42)	22,3	25,5 \pm 17,2	23 (1-82)	22	3,34 \pm 2,52	2,64 (0,15-12,2)	2,35

* p= 0,473 (classe de BMI en fonction de l'âge) ** p= 0,132 (classe de BMI en fonction du tabagisme)

*** p= 0,61 (tabac en fonction de l'âge) **** p= 0,136 (tabac en fonction du BMI)

Nous avons ensuite étudié l'association entre le CFA et l'AMH. Ils apparaissent fortement corrélés entre eux comme en témoigne le coefficient de corrélation de Pearson à 0,785 ($p < 0,001$). Par analyse de régression linéaire nous avons établi les formules suivantes : $AMH = 0,42 + (0,11 \times CFA)$ et $\log AMH = -0,009 + (0,016 \times CFA)$. Cette relation entre CFA et AMH est illustrée par les **figures 8 et 9**. Ces formules semblent valables uniquement pour des valeurs de CFA non extrêmes comprises entre 10 et 50.

Figure 8

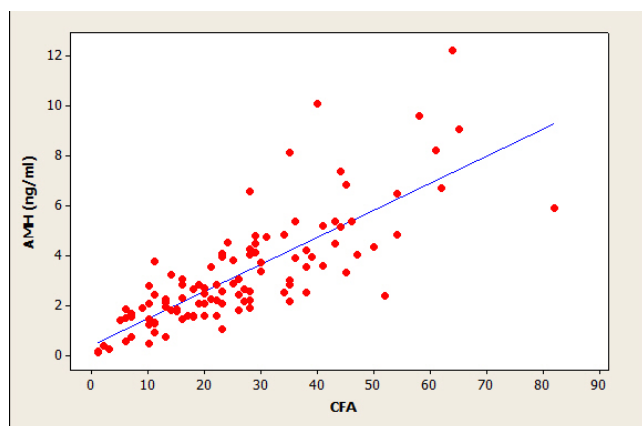


Figure 8 : relation entre le CFA et l'AMH. La ligne représente la valeur d'AMH attendue pour un CFA donné. Cette figure met en évidence la moins bonne faisabilité de cette relation pour les valeurs de CFA supérieures à 50.

Figure 9

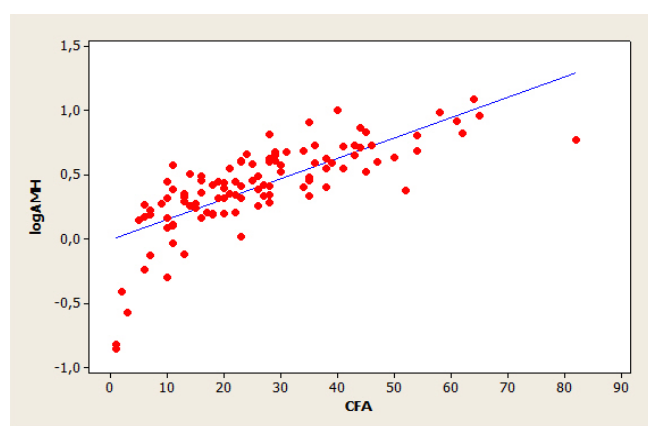


Figure 9 : relation entre le CFA et log d'AMH. La ligne représente la valeur de log d'AMH attendue pour un CFA donné. Cette figure met en évidence la moins bonne faisabilité de cette relation pour les valeurs de CFA supérieures à 50 mais également pour celles inférieures à 10.

3) Discussion

Notre étude est à notre connaissance la première cohorte prospective qui observe le CFA en regard d'un dosage de l'AMH dans une population ayant fait preuve d'une fertilité récente. Le but de notre étude était d'établir les valeurs normales du CFA au regard d'un dosage d'AMH en fonction de groupes d'âge. Nous nous sommes basés sur l'hypothèse que le CFA et l'AMH sont stables tout au long du cycle (21) ; (34,35,40,41), que le taux d'AMH est le même pendant le 1^{er} trimestre de grossesse qu'avant la grossesse (42,43). Par ailleurs dans l'étude de V.MASSE il n'y avait pas de corrélation entre le taux d'AMH et l'âge gestationnel (36). Nous nous sommes également assurés que l'utilisation de l'échographie 2D était comparable et toujours adaptée par rapport au 3D (24,25). Pour limiter la variation opérateur dépendant (23), l'ensemble des échographies a été réalisé par le même opérateur. Les effectifs des différents sous-groupes ne sont pas équivalents du fait de la distribution de l'âge des patientes qui consultent dans le service d'orthogénie.

Nos résultats de CFA mettent en évidence, comme dans les études précédentes, un déclin de celui-ci avec l'avancement de l'âge et ceci chez des patientes ayant fait preuve d'une fertilité récente. Ce processus de vieillissement physiologique avec diminution de la réserve folliculaire est retrouvé dans la population générale (17,44) mais également dans des populations ayant fait preuve d'une fertilité ancienne (12,16) ainsi que dans notre cohorte ayant fait preuve d'une fertilité récente. Notre étude retrouve également une décroissance linéaire du CFA comme dans la majorité des études (16,41,45) et non une diminution biphasique comme décrite par Scheffer (12). Notre CFA médian est de 23. Ce résultat est nettement supérieur à celui retrouvé dans l'étude d'A. La Marca en 2011 qui était de 8. Ceci

peut s'expliquer par l'âge médian de notre cohorte qui est de 25 ans alors qu'elle était de 38 ans dans leur étude. Si on compare par sous-groupe d'âge équivalent, on constate également que nos valeurs de CFA sont plus élevées de 1,3 à 2,1 fois selon l'âge des patientes, sauf pour notre sous-groupe ≥ 40 ans où nous avons une médiane inférieure mais difficilement interprétable du fait de notre faible échantillon de patientes (n=5). Dans ce cas, les différences observées pourraient être liées à l'utilisation dans notre étude, d'une sonde large bande et à l'amélioration des images en échographie notamment par l'augmentation de la capacité des appareils actuels à distinguer l'image réelle du bruit de fond. Nos résultats vont cependant dans le sens de l'étude de Dewailly faite sur un Voluson E8 avec une sonde endovaginale de 5-9 MHz (46). Ce dernier rediscutait le critère échographique de Rotterdam, jusque-là largement utilisé pour le diagnostic du SOPK et proposait un cut off de 19 follicules par ovaire plutôt que 12. Selon lui, avec les nouveaux échographes, une limite à 12 follicules par ovaire surestimerait le diagnostic de SOPK.

Concernant les taux d'AMH, la seule étude dans la littérature concernant ses valeurs dans une population fertile est celle de V.Massé (36). Elle retrouvait un taux médian de 2,42 ng/ml avec le kit Beckman Gen II ELISA pour un âge médian de 27 ans. Nous retrouvons dans notre étude un taux médian de 2,64 ng/ml avec un âge médian de 25 ans avec le kit Ultrasensitive AMH/MIS ELISA Anshlabs. Nos résultats sont légèrement plus élevés (de 10%) pour un âge médian comparable et sont en accord avec ce qui est connu des différents kits d'AMH. En effet, le kit UltraSensitive AMH/MIS Elisa est issu de l'ancien kit DSL connu pour avoir des résultats comparables à la technique ancestrale d'Immunotech alors que le kit Beckman Gen II est une association des techniques Immunotech et DSL pour lequel les résultats étaient légèrement inférieurs à ceux retrouvés avec Immunotech seul.

Nous avons retrouvé une forte association entre le CFA et l'AMH. Ceci est également conforme aux données de la littérature. (15).

Comme dans l'étude de V.Massé en 2011, nous n'avons pas retrouvé de différence du CFA ou du taux d'AMH entre les patientes fumeuses et non-fumeuses, ceci dans des groupes comparables en terme de IMC, d'âge et de nombre de patientes. Ces résultats diffèrent des données de la littérature qui suggèrent un impact négatif du tabac sur plusieurs étapes de la fonction reproductive (47–49) avec une augmentation du délai nécessaire pour concevoir, proportionnelle à la quantité de cigarettes consommées (50). Deux études se sont particulièrement intéressées à l'impact du tabagisme sur l'état de la RO. La première concernait des patientes infertiles (51) et notait une diminution du CFA et de l'AMH chez des patientes infertiles fumeuses ; la seconde a été réalisée dans la population générale sans antécédent d'infertilité mais uniquement de 38 à 50 ans (52) et retrouvait également une diminution de la réserve ovarienne avec une diminution de l'AMH chez les patientes fumeuses. Nos résultats peuvent s'expliquer par un biais de sélection. En effet, nous avons volontairement sélectionné des patientes fertiles pour qui le tabac n'a pas ou pas encore altéré la RO, du fait d'une sensibilité personnelle moindre à la toxicité de la cigarette ou du fait de leur jeune âge. Ceci supposerait qu'il y ait une variabilité inter-individuelle à l'exposition tabagique et que ce serait l'association de l'avancement de l'âge de la femme et du tabagisme qui serait le plus délétère sur la RO, avec un impact très probable de la durée d'exposition au tabac.

En revanche, nous notons dans notre étude une tendance à la baisse du CFA et de l'AMH avec l'augmentation du IMC, et ceci dans des groupes comparables en terme d'âge et de tabagisme. Nos résultats ne sont pas significatifs mais s'en approchent concernant l'association CFA et IMC. L'absence

de significativité pourrait être liée à des effectifs trop faibles dans les sous-groupes IMC 25-29,9 (n=16) et $\text{BMI} \geq 30$ (n=7). Il est bien admis que le surpoids ou l'obésité sont un facteur de risque d'infertilité notamment par oligo-anovulation (53), d'augmentation du taux de fausses couches spontanées (54) et d'échec en AMP (55,56). Il a également été décrit que l'obésité diminuait les chances de grossesse spontanée chez des patientes avec cycles réguliers (Van der Steeg et al. 2008). En revanche, très peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'augmentation du BMI sur les marqueurs de la RO. Une étude réalisée sur un groupe de femmes infertiles avait retrouvé une baisse du CFA qui n'était significative que sur l'ovaire droit. Dans cette étude, Il n'y avait pas eu de dosage de l'AMH (58). Dans notre étude, on observe une tendance à la diminution du CFA et du taux d'AMH avec l'augmentation du IMC chez des patientes ayant fait preuve récente de leur fertilité. Le surpoids et l'obésité bien connus pour être des facteurs d'infertilité, sembleraient être responsables d'une diminution de la RO sans que nous puissions le prouver dans notre étude.

Concernant la RO en fertilité spontanée, si nous utilisons les critères de Bologne normalement utilisés en AMP pour prédire les mauvaises répondeuses (59), nous retrouvons dans notre étude 4 patientes avec un CFA inférieur à 5 (3,4%) avec une médiane d'âge de 41,5 ans [39 - 42] ; 8 patientes avec un CFA inférieur à 7 (6,9%) avec un âge médian de 37,5 ans [28 - 42]. Pour l'AMH, nous retrouvons 4 patientes avec un taux inférieur à 0,5 (3,4%) avec une médiane d'âge de 41,5 ans [39 - 42] et 10 patientes (8,6%) avec un taux d'AMH inférieur à 1,1 et un âge médian de 33,5ans [22 - 42]. Au total, nous retrouvons 3 à 9% de notre population avec des marqueurs de réserve ovarienne décrits comme péjoratifs selon les critères de Bologne, mais cela reste une minorité de notre cohorte et comme pour le tabac, leur présence peut être biaisée par le recrutement au sein d'une population récemment

fertile. L'aspect quantitatif de la RO déjà utilisé pour prédire la réponse à la stimulation folliculaire en FIV, pourrait-elle avoir une valeur pronostique en terme de fertilité spontanée ?

Les limites de notre étude sont essentiellement liées à nos effectifs. Si les sous-groupes 20 à 24 ans et 25 à 29 ans semblent suffisants, les autres tranches d'âges sont beaucoup moins représentées. Ceci n'empêche pas de retrouver une diminution significative du CFA et de l'AMH avec l'augmentation de l'âge, mais cette relation âge/CFA ou âge/AMH apparaît seulement d'intensité modérée. Une plus forte association aurait peut-être été retrouvée si les effectifs des âges supérieurs à 35 ans avaient été plus importants. De plus, nous avons observé une diminution du CFA et de l'AMH avec l'augmentation du IMC mais cette diminution n'est pas significative, peut-être du fait de trop faibles effectifs de patientes en surpoids et obèses. On peut citer également une limite dans la réalisation de notre CFA et du dosage d'AMH. En effet, il est recommandé de les réaliser à J3 (18) mais ce n'était pas réalisable dans notre étude. Nous avons donc essayé d'en minimiser l'impact par nos critères d'exclusion. Enfin, notre étude a été réalisée sur des patientes récemment fertiles ; les résultats ne sont pas extrapolables sur des populations infertiles mais peuvent néanmoins servir de normes pour une meilleure interprétation du CFA et du taux d'AMH.

4) Conclusion

Nous avons établi les valeurs du CFA au regard d'un dosage d'AMH par groupe d'âge dans une population récemment fertile. En accord avec la littérature, les valeurs de CFA et du taux d'AMH

diminuent significativement avec l'augmentation de l'âge et cette diminution apparaît linéaire dans notre étude. Une forte association entre CFA et AMH a été retrouvée. Nous nous sommes intéressés à 2 autres facteurs responsables d'hypo fertilité : le tabagisme et le poids. Dans notre étude, aucun lien significatif n'a pu être mis en évidence entre ces facteurs et nos marqueurs de RO. En revanche, nous avons observé une tendance à la diminution du CFA et de l'AMH avec l'augmentation du IMC. Enfin, nous pouvons souligner une grande variabilité dans les résultats, que ce soit pour le CFA ou le taux d'AMH, dans les mêmes groupes d'âge mais où seulement 3 à 9 % des patientes présentent des critères de RO altérés selon les critères de Bologne. On se pose alors la question de l'impact de la RO en fertilité spontanée. Cependant, dans notre étude, l'altération de la RO n'empêche pas d'obtenir une grossesse spontanée.

ARTICLE

**Soumis le 28/09/2015 pour publication dans la revue
HUMAN REPRODUCTION**

Quantitative description of the ovarian reserve using the antral follicle count associated with anti-Müllerian hormone evaluation in a population of recently fertile women

S. Rullan ^{1,*}, I. Fatfouta ¹, P. Ferrari ², P. Staccini ³, V. Isnard ¹, A. Bongain ¹

¹Department of Gynecology, Obstetrics and Reproduction, Archet II Hospital, Nice Sophia Antipolis University, 151 Rte de St Antoine de Ginestière, 06202 Nice Cedex 3, France. ²Department of Hormonology, Archet II Hospital, 151 Rte de St Antoine de Ginestière, 06202 Nice Cedex 3, France. ³ Nice University Hospital's Department of Medical Information, Statistics and Informatics, Cimiez Hospital, 4 Ave Victoria, 06003 Cedex 1, France.

* Corresponding address: Department of Gynecology, Obstetrics and Reproduction, Archet II Hospital, Nice Sophia Antipolis University, 151 Rte de St Antoine de Ginestière, 06202 Nice Cedex 3, France. Tel : +33-492036105 ; Fax : +33-492036563; E-mail : rullansolenne@hotmail.fr

INTRODUCTION: The antral follicle count (AFC) and the levels of anti-Müllerian hormone (AMH) are the most used markers, along with the patient's age and the basal FSH, to evaluate the ovarian reserve (OR) before assisted reproduction treatment. AFC normal values in a fertile population have never been described and the AMH values in that same population were described for one kit only. Our aim in this study was an OR quantitative description in recently fertile patients by measuring the AFC associated with the AMH levels.

MATERIAL AND METHODS: Observational study conducted from August 2014 to January 2015, including 116 patients aged between 18 and 43 years, recently fertile. We studied their OR data by measuring AFC and AMH levels, using the UltraSensitive AMH/MIS ELISA kit from Anshlabs. The impact of age, smoking status and body mass index (BMI) on our markers was assessed.

RESULTS: The median AFC was 23 [1 – 82] and the median AMH level was 2.64 ng/ml [0.14 – 12.2]. The AFC and AMH values were statistically higher before the age of 30. AFC and AMH levels appeared to be strongly correlated with a Pearson's index value of 0.78. This correlation was represented by the following formula: $\text{Log AMH} = -0.009 + (0.016 \times \text{AFC})$.

CONCLUSION: We could establish the AFC and AMH values by age groups in a recently fertile population. A linear decrease with age could be found ($p < 0.001$). Smoking didn't modify AMH and AFC values, BMI seemed to alter the OR markers but not significantly.

KEY WORDS: antral follicle count / AMH / ovarian reserve / fertile women.

Introduction

The ovarian reserve (OR) is established during prenatal life and reaches its peak number at 5 – 7 months of gestation. This primordial follicle pool is ultimately depleted by degeneration and progression through folliculogenesis until exhausted at the

onset of menopause (Kerr, Myers, and Anderson 2013). The decline of female reproductive function is thus age-related, due to the decrease of the primordial follicle pool and the oocyte quality (Haadsma *et al.* 2007). The OR markers were mainly studied to predict the outcome of ovarian stimulation. For that purpose, the antral follicle count (AFC) and the anti-Müllerian hormone (AMH) levels seem to be the markers with the best

predictive value (Barbakadze *et al.* 2015; Eldar-Geva *et al.* 2005; Kwee *et al.* 2007; Kwee *et al.* 2008; Bancsi *et al.* 2002). AFC is nowadays a routine test to assess a woman's OR in assisted reproduction technology (ART) and is considered a quantitative marker of OR (Haadsma *et al.* 2007). It is recognized, even if it has not been proven, that AFC mirrors the remaining primordial follicle pool. In 2010, Broekmans (Broekmans *et al.* 2010) published recommendations on how to perform an AFC, in order to improve the relevance of this test in clinical practice and future clinical trials. In 2011, La Marca (Antonio La Marca *et al.* 2011) reported the AFC values during reproductive life. This was the first document reporting reference AFC values according to the age in the general population. Measurement of the AMH level is also used routinely in ART. AMH is a 140 kDa dimeric glycoprotein, exclusively of ovarian origin (Long *et al.* 2000; Antonio La Marca *et al.* 2005), secreted by follicles from the primary through the antral stage of follicular growth. It is considered a quantitative marker of OR (Ebner *et al.* 2006; van Disseldorp *et al.* 2008). Its normative values for the GEN II Beckman kit were published in 2011 (Massé *et al.* 2011). To the best of our knowledge, there is, so far, no observation concerning the AFC in a recently proven fertile population, and no study assessing the AFC and AMH levels on this same population. Our aim was to assess the OR, using antral follicle count and AMH levels, in a population of naturally fertile women in order to provide reference values.

Material and Methods

Patients and investigations

We conducted an observational prospective study on a cohort of patients with less than 4 month-old established fertility and having just had a voluntary interruption of pregnancy, allowed in France until 14 weeks' amenorrhea. Data were collected between August 2014 and January 2015 in the abortion service of the Department of Gynecology, Obstetrics and Reproduction, Nice University Hospital, France. To confirm a complete abortion, the French National Authority for Health recommends performing a plasmatic or serial human chorionic gonadotropin (hCG) test or an ultrasound examination documenting an empty uterus. In our service, we systematically perform an ultrasound examination. Were eligible all the patients aged 18 years or more, coming for their follow-up visit, routinely scheduled 15 days after the medical or surgical abortion; during this follow-up visit, a transvaginal ultrasonography was performed. During this same appointment, all patients were informed of the study by the

investigator. For the patient agreed to participate in the study a questionnaire and an informed consent form were filled in and signed. The standardized questionnaire asked for information about: ethnicity, medical and surgical history, smoking status, height, weight, parity and menstrual cycle regularity. We also looked for clinical manifestations of hyperandrogenism such as hirsutism, associated or not with acne. The ultrasound examination documenting an empty uterus was completed by an antral follicle count. The patients presenting an ovarian cyst, a follicle or a corpus luteum measuring more than 10 mm were not included, as well as the patients for whom one of the ovaries couldn't be seen. At the end of the consultation, the results of the AMH levels test, realized during the preoperative examination, were retrieved and recorded in the questionnaire.

Ultrasonography

The transvaginal ultrasonography was performed using a Voluson 730 Expert (General Electric Systems, France) with a RIC 5-9 MHz probe. The AFC was achieved by an ultrasound scan from the upper part to the lower part of the right and left ovaries, repeated 2 times. The biggest follicle(s) was (were) measured using 2 diameters and if a follicle was > 10 mm, the patient was then not included from the study. All the data collection and the ultrasound examinations were performed by the investigator.

AMH

AMH levels analysis was always performed in the Department of Hormonology, Nice University Hospital, using the UltraSensitive AMH/MIS ELISA kit (Anshlabs, Webster, USA), used in France since the end of 2013. The samples, stored at -20°C, were processed during the weekly routine analysis in the laboratory. This kit has been used in our center since August 2014. The UltraSensitive AMH/MIS ELISA is a quantitative 3-step sandwich type immunoassay, using monoclonal antibodies. The assay volume is 25 µl/ sample, run in duplicate. The coefficient of variation (CV) is 4% within run and 1.98% between run for a 1.85 ng/ml concentration. The lowest amount of AMS/MIS in a sample that can be detected with a 95% probability is 0,02 ng/ml. The estimated minimum dose achieved at 20% total imprecision is 0,06 ng/ml. The detection limit is set at 0,10 ng/ml.

Statistical analysis

The qualitative variables analysis was expressed in frequencies and percentages. The quantitative variables

analysis was expressed in average \pm standard deviation. Because of the strata sizes, often below 30, the median and the interquartile range were also calculated. The assessment of a potential association between two qualitative variables (age group, BMI group, smoking group) was done using the chi-square test. The assessment of a potential association between two quantitative variables (AFC, AMH) was done using the Pearson's correlation coefficient. The AMH values were log converted to perform the tests. A model of simple linear regression was used to study the association between the age groups, BMI groups, smoking or not smoking groups, AFC and AMH values (calculation of coefficient of Pearson). All the statistical tests were performed with an a priori alpha risk set at 0.05.

Results

The total number of patients seen for this study was 152. After the ultrasonography examination, 36 were not included. A cohort of 116 patients was eventually selected for statistical analysis. None of the selected patients had any gonado-toxicity history, two patients had undergone a unilateral ovariectomy of unknown etiology. The population's median age was 25 years [18 – 43], the median BMI was 21.8 [17.5 – 38.1], 13.8% of the patients were overweight and 6.0% were obese. 49% of the patients were smokers. The median parity was 2 and increased with age. 95 patients (82%) had regular menstrual cycles, 4 were affected by spaniomenorrhea and 2 patients showed signs of hyperandrogenism without associated overweight. The demographic characteristics of our cohort by age groups are reported in **Table I**.

The median AFC was 23 [1 – 82] with the 25th and 75th percentiles at 14.75 and 35, respectively; the median AMH was 2.64 ng/ml [0.14 – 12.2] and the 25th and 75th percentiles were 1.84 ng/ml and 4.14 ng/ml respectively. These results are reported in **Table II** for the total population and organized by age groups. The median, interquartiles, highest and lowest AFC values are illustrated in **Figure 1** and the median, interquartiles, highest and lowest AMH concentrations are illustrated in **Figure 2**.

The group comparison highlighted an elevated AMH concentration associated to an elevated AFC before the age of 30, with a median AMH of 3.04 and a median AFC of 28, while after the age of 30 the median AMH was 1.83 and the median AFC was 13. This difference is statistically significant with $p < 0.001$.

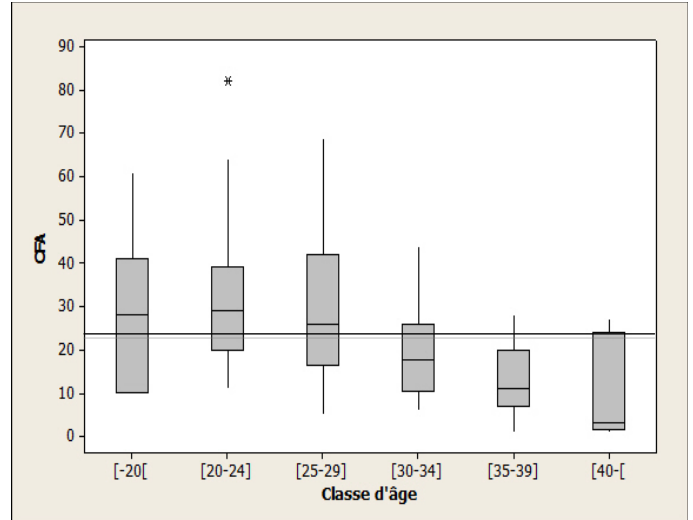


Figure 1: AFC values by age groups: < 20 years-old (n=11); from 20 to 24 years-old (n=43); from 25 to 29 years-old (n=29); from 30 to 34 years-old (n=16); from 35 to 39 years-old (n=12) and ≥ 40 years-old (n=5). In each box, the horizontal line represents the median, the box represents the limits of the 25th and 75th percentiles and the vertical bar represents the highest and lowest values. The median AFC is 23 for the overall cohort and is represented by the horizontal line.

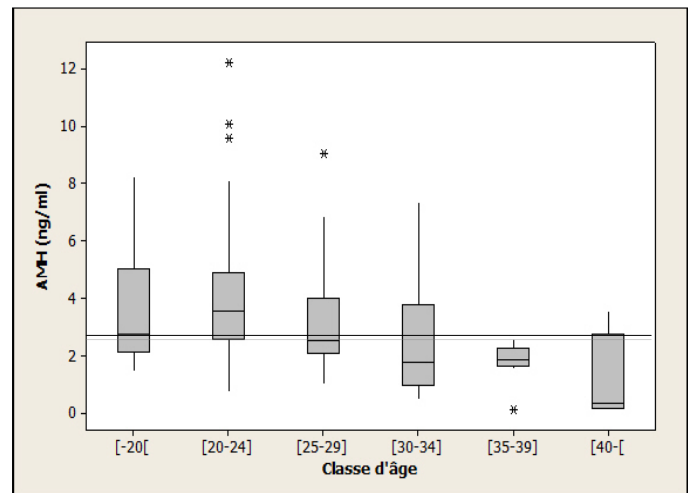


Figure 2: AMH concentration values by age groups: < 20 years-old (n=11); from 20 to 24 years-old (n=43); from 25 to 29 years-old (n=29); from 30 to 34 years-old (n=16); from 35 to 39 years-old (n=12) and ≥ 40 years-old (n=5). In each box, the horizontal line represents the median, the box represents the limits of the 25th and 75th percentiles and the vertical bar represents the highest and lowest values. The median AMH level is 2.64 for the overall cohort and is represented by the horizontal line.

Tableau 123 Demographic characteristics

Age group (years)	AGE in years	BMI, Kg/m ²					SMOKING		PARITY	MENSTRUAL CYCLES	
	Average ± Standard deviation (min-max) [Median]	<18,5	18,5-24,9	25-29,9	≥30	Average ± Standard deviation (min-max) [Median]	yes	no	Median (min-max)	regular	irregular
<20 years (n=11; 9,5%)	19 ± 1 (18-19) [19]	1	7	2	1	22,3 ± 1,1 (18,4-31,6) [20,3]	6	5	1,0 (1-1)	10	1
20-24 years (n=43; 37,1%)	22 ± 1 (20-24) [22]	7	32	4	0	21,3 ± 1,2 (17,5-27,3) [21,1]	20	23	1,0 (1-5)	33	10
25-29 years (n=29; 25,0%)	27 ± 1 (25-29) [27]	1	18	6	4	24,3 ± 1,2 (17,5-38,1) [22,2]	13	16	2,0 (1-6)	23	6
30-34 years (n=16; 13,8%)	32 ± 1 (30-34) [32]	1	15	0	0	20,8 ± 1,7 (17,6-24,8) [20,5]	10	6	4,0 (1-6)	15	1
35-39 years (n=12; 10,3%)	37 ± 1 (35-39) [37,5]	1	6	3	2	24,9 ± 1,2 (18,0-32,4) [24,5]	7	5	4,5 (2-9)	11	1
≥40 years (n=5; 3,3%)	42 ± 1 (40-43) [42]	0	4	1	0	22,2 ± 1,2 (19,8-25,5) [21,8]	1	4	3,0 (2-7)	3	2
TOTAL (n=116; 100%)	27 ± 1 (18-43) [25]	11 9,50%	82 70,70%	16 13,80%	7 6,00%	22,5 ± 1,3 (17,5-38,1) [21,8]	57 49%	59 51%	2,0 (1-9)	95 81,90%	21 18,10%

Tableau 124 Distribution of AMH concentration and AFC

Age group (years)	CFA					AMH				
	Average ± Standard Deviation (min-max)	Percentile			EIQ	Average ± Standard Deviation (min-max)	percentile			EIQ
		25	50	75			25	50	75	
<20 years (n=11; 9,5%)	29,2 ± 1,7, 4 (10-61)	10	28	41	31	3,68 ± 1,16 (1,47-8,23)	2,12	2,78	5,03	2,91
20-24 years (n=43; 37,1%)	32,1 ± 1,5, 7 (11-82)	20	29	39	19	4,13 ± 1,43 (0,76-12,2)	2,57	3,55	4,92	2,35
25-29 years (n=29; 25,0%)	29,3 ± 1,6, 2 (5-69)	16,5	26	42	25,5	3,18 ± 1,82 (1,04-9,06)	2,07	2,53	4,02	1,95
30-34 years (n=16; 13,8%)	18,7 ± 1,0, 4 (6-44)	10,2	17,5	25,7	15,5	2,36 ± 1,91 (0,50-7,35)	1	1,79	3,79	2,79
35-39 years (n=12; 10,3%)	12,9 ± 1,0, 0 (1-28)	7	11	19,25	12,7	1,81 ± 1,66 (0,14-2,57)	1,64	1,88	2,25	0,6
≥40 years (n=5; 3,3%)	10,8 ± 1,2, 3 (1-27)	1,5	3	24	22,5	1,09 ± 1,65 (0,15-3,56)	0,18	0,33	2,77	2,59
TOTAL (n=116)	26,4 ± 1,6, 1 (1-82)	14,2	23	35	20,8	3,26 ± 2,20 (0,14-12,2)	1,83	2,64	4,2	2,37
Confidence interval	[23,4-29,3]	[20,9-28]			[14,2-28,4]	[2,8-3,7]	[2,3-3,1]			[1,9-2,5]

The age, tobacco and BMI variables ($< 18,5$ / $18,5-24,9$ / $25-29,9$ / >30) were studied as variation factors of the AFC and AMH. No significant link was found between these three variables, which appeared independent of each other in our study. The general regression model underlined a statistically significant correlation only for the age variable with $p<0.001$ for the AFC and $p=0.003$ for the AMH, with a moderate intensity as demonstrated by the Pearson's coefficient at -0.45 for the AFC and -0.41 for the AMH. The associations tobacco / AFC or tobacco / AMH were not significant with $p=0.47$ and $p=0.80$, respectively. As for the association BMI / AFC, we noted an association close to significance with $p=0.09$, while there was no significant link between BMI and AMH with $p=0.24$. The significant link between age and our markers is illustrated in **Figures 3, 4 and 5**. We noticed a linear decrease of the AFC and AMH with the increase of the patient's age.

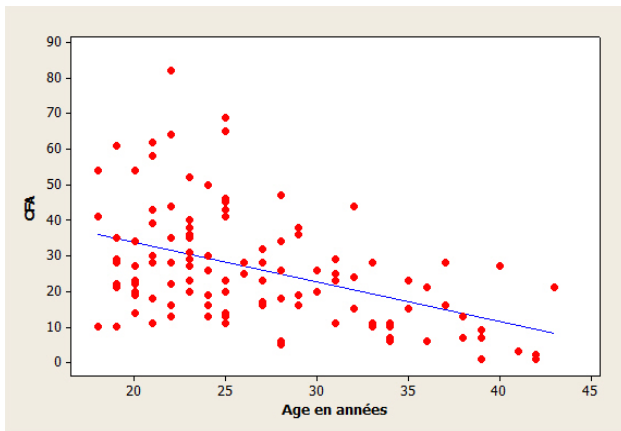


Figure 3: Association between age and AFC. There is a significant negative correlation between the age and the AFC, with a Pearson's coefficient $= -0.45$ ($p=0.0001$).

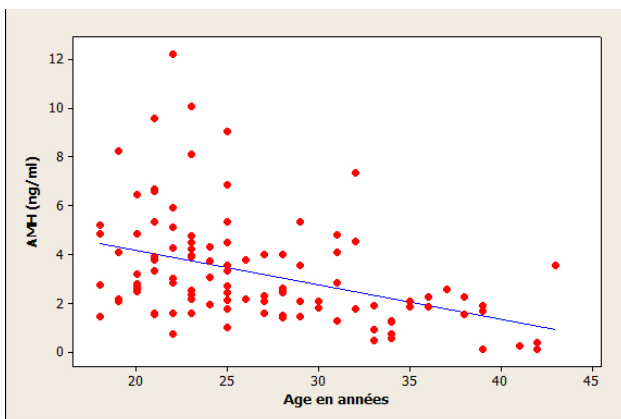


Figure 4 : Association between age and AMH levels. There is a significant negative correlation between the age and the AMH level, with a Pearson's coefficient $= -0.41$ ($p=0.0001$).

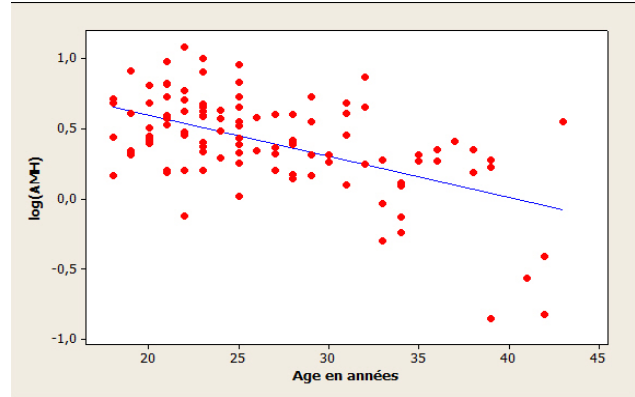


Figure 5: Association between age and \log_{10} AMH levels. There is a significant negative correlation with a Pearson's coefficient 0,752 ($p< 0,001$).

Concerning the BMI groups, we noticed a trend toward an AFC and AMH decrease with the BMI increase in the groups where the median age is always below 30. This association was not significant but was close to significance when considering the association BMI / AFC. These results are illustrated in **Figures 6 and 7**.

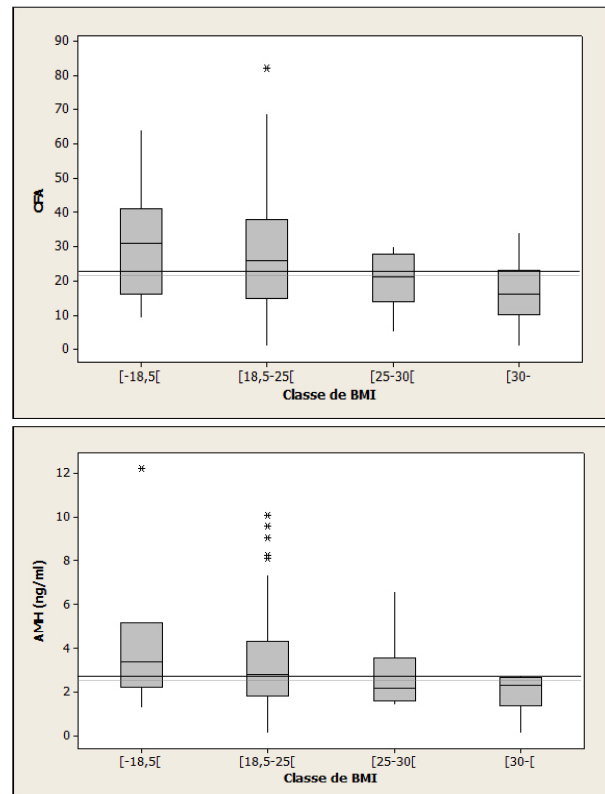


Figure 6 and 7: Distribution of AFC values ($p<0.009$) and AMH concentrations ($p=0.24$) by BMI group: < 18.5 ($n=11$); $18.5 - 24.9$ ($n=82$); $25 - 29.9$ ($n=16$); ≥ 30 ($n=7$). In each box, the horizontal line represents the median, the box represents the limits of the 25th and 75th percentiles and the vertical bar represents the highest and lowest values.

Concerning the smoking status, no difference was found for the AFC and AMH levels between the smoking and non-smoking patients, with a median AFC of 25 for the smokers vs 23 for the non-smokers, and a median AMH of 2.78 vs 2.64, for the smokers and non-smokers respectively. The median age was 25 years in both sub-groups. The average values with standard deviation and the median AFC and AMH organized by BMI and smoker vs non-smokers groups are reported in **Table III**.

We then studied the association between AFC and AMH. They appeared to be strongly correlated to each other as demonstrated by the Pearson's coefficient at 0.785 ($p < 0.001$). From a linear regression analysis, we established the following formulas: $AMH = 0.42 + (0.11 \times AFC)$ and $\log_{10} AMH = -0.009 + (0.016 \times AFC)$. This correlation between AFC and AMH is illustrated in **Figures 8 and 9**. These formulas seemed to be valid only for non-extreme AFC values comprised between 10 and 50.

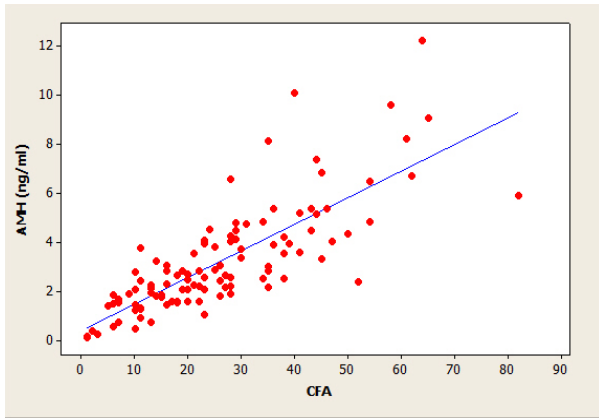


Figure 8: Association between AFC and AMH. The line represents the expected AMH value for a given AFC. This figure points out the lower feasibility of this association for the AFC values above 50.

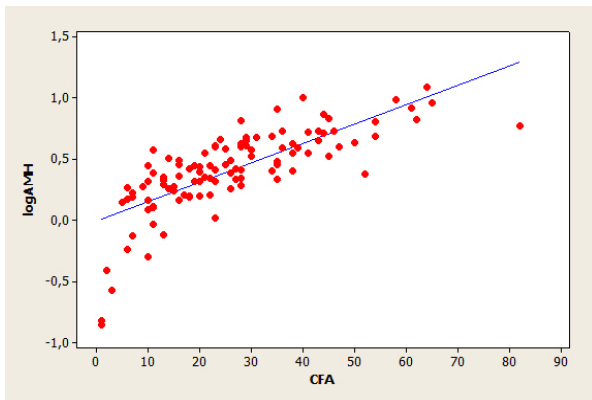


Figure 9: Association between AFC and \log_{10} AMH. The line represents the expected \log AMH value for a given AFC. This figure points out the lower feasibility of this association for the AFC values above 50 but also for the AFC values below 10.

Tableau III: AFC and AMH Variation by BMI and smoker vs non-smoker groups

BMI group	Median Age (min-max)	Smoker	Average AFC standard deviation	Median AFC (min-max)	EIQ	Average AFC standard deviation	Median AMH (min-max)	EIQ
<18,5-18,9	22 [18-39]	6 [54,5%]	29,9 [6,7]	31 [9-64]	25	4,21 [1,130]	3,39 [1,31-12,20]	2,93
18,5-24,9	25 [18-43]	42 [51,2%]	28,0 [7,1]	26 [1-82]	23,2	3,33 [2,20]	2,82 [0,15-10,09]	2,51
25-29,9	26 [19-40]	4 [25%]	19,9 [8,05]	21 [5-30]	14	2,72 [1,46]	2,2 [1,40-6,58]	2
≥30	28 [18-39]	4 [57,1%]	16,6 [10,3]	16 [1-34]	13	2,00 [1,98]	2,31 [0,14-2,78]	1,29
Smoker	Median Age (min-max)	Median BMI	Average AFC standard deviation	Median AFC (min-max)	EIQ	Average AFC standard deviation	Median AMH (min-max)	EIQ
YES	25 [18-43]	21,2	27,3 [4,9]	25 [1-65]	22,5	3,19 [1,83]	2,78 [0,14-9,06]	2,37
NO	25 [18-42]	22,3	25,5 [7,2]	23 [1-82]	22	3,34 [2,52]	2,64 [0,15-12,2]	2,35

* $p = 0.473$ (BMI group by age); ** $p = 0.132$ (BMI group by smoking status); *** $p = 0.61$ (smoking status by age); **** $p = 0.136$ (smoking status by BMI)

Discussion

This study was, to the best of our knowledge, the first prospective cohort that analyzed the AFC in regard to the AMH levels in a recently proven fertile population. The aim of our study was to establish reference AFC values in regard to the AMH levels, depending on the age group. We based our study on the hypothesis that the AFC and AMH are stable throughout the cycle (van Disseldorp *et al.* 2010; A. La Marca *et al.* 2005; A. La Marca *et al.* 2010; Tsepidelis *et al.* 2007; Hehenkamp *et al.* 2006), that the AMH level is the same during the first pregnancy trimester and before the pregnancy (A. La Marca *et al.* 2005; Nelson *et al.* 2010). Furthermore, in V. Massé's study, there was no correlation between the AMH level and the gestational age (Massé *et al.* 2011). We also made sure that the 2D ultrasound was comparable and always suitable compared to 3D (Scheffer *et al.* 2002; Jayaprakasan *et al.* 2007). In order to limit the operator-dependent variability (Hansen *et al.* 2003), all the ultrasound analyses were performed by the same operator. The number of patients in each of the different age groups was not equivalent due to the age distribution of the patients coming to the abortion service.

Our AFC results showed, as in previous studies, an AFC drop with aging, for patients who were recently proven fertile. This process of physiological aging with a decrease of the follicular reserve is found in the general population (Ruess *et al.* 1996; A. La Marca *et al.* 2011) but also in populations having been proven fertile at some point in the past (Scheffer *et al.* 1999; Scheffer *et al.* 2003) and in our cohort of patients recently proven fertile. Additionally, our study found a linear decrease of the AFC as in the majority of the studies (Scheffer *et al.* 2003; A. La Marca *et al.* 2010; Rosen *et al.* 2010) and not a biphasic reduction as described by Scheffer (Scheffer *et al.* 1999). Our median AFC was 23. This result was well above the one found in A. La Marca's study in 2011, which was 8. This could be explained by our cohort's median age of 25 years, while the median age in their study was 38 years. When we compared sub-groups of equivalent age, we also noticed that our AFC values were 1.3- to 2.1-fold higher, depending on the patient's age, except for our ≥ 40 years-old sub-group. In this sub-group, we had a lower median but it was arduous to interpret because of the low number of patients ($n=5$). In that case, the differences we observed could be linked to the fact that we used a wide band probe and to the improvement of ultrasound imagery, notably because of the increasing capacity of current equipment to distinguish real image from background noise. However, our results pointed in the same direction than Dewailly's study on a Voluson E8 with a transvaginal 5-9 MHz probe (Dewailly *et al.* 2011). In that study, he discussed the Rotterdam ultrasound criteria, widely used for PCOS diagnosis until then, and proposed a cut off of 19 follicles per ovary instead of 12. According to him, with the new ultrasound systems, a

limit of 12 follicles per ovary would overestimate the PCOS diagnosis.

As for the AMH levels, the only study in the literature examining its values in a fertile population was V. Massé's (Massé *et al.* 2011). They found a median level of 2.42 ng/ml, using the Beckman Gen II ELISA kit, for a median age of 27 years. In our study, we found a median level of 2.64 ng/ml for a median age of 25 years, using the Ultrasensitive AMH/MIS ELISA kit, Anshlabs. Our results were slightly higher (10%) for a comparable median age and were consistent with what is known about the different AMH kits. Indeed, the Ultrasensitive AMH/MIS ELISA kit comes from the older DSL kit, known to provide results comparable to those of the Immunotech ancestral technique, while the Beckman Gen II ELISA kit is an association of the Immunotech and DSL techniques and provides results slightly lower than the results obtained with Immunotech alone. We found a strong association between the AFC and AMH, which was also consistent with the literature data (Barbakadze *et al.* 2015).

As in the V. Massé's study from 2011, we didn't find any difference in the AFC or AMH levels between smokers and non-smokers patients, and this in comparable groups in terms of BMI index, age and number of patients. These results were different from those in the literature that suggest a negative impact of tobacco on different stages of the reproductive function (Midgette & Baron 1990; Adena & Gallagher 1982; Dechanet *et al.* 2011), with an increase of the delay necessary for conceiving proportional to the quantity of cigarettes consumed (Curtis, Savitz, and Arbuckle 1997). Two studies focused specially on the impact of smoking on the OR status. The first one studied infertile patients (Freour *et al.* 2012) and noted a decrease of the AFC and AMH for infertile smoking patients; the second study was conducted on the general population without infertility antecedents but only from 38 to 50 years of age (Plante *et al.* 2010), and also found an ovarian reserve's decrease and a diminution of the AMH in smoking patients. Our results could be explained by a selection bias. Indeed, we voluntarily selected fertile patients for which tobacco had not, or not yet, altered the OR, because of an individual lower sensitivity to tobacco toxicity or because of the patient's younger age. This would suppose that there would be an inter-individual variability to tobacco exposition and that the female aging process associated with the patient's smoking would be the most deleterious factors impacting the OR status, with a very likely impact of the length of the patient's tobacco exposition.

In contrast, we noted in our study a tendency towards a decrease of AFC and AMH when the BMI was increasing, in groups comparable in terms of age and smoking status. Our results were not significant but came close to significance for the AFC and BMI association. The absence of significance could be linked to insufficient numbers in the sub-groups of BMI 25 – 29.9 ($n=16$) and BMI ≥ 30 ($n=7$). It is well admitted

that overweight or obesity represents a risk factor of infertility, notably because of oligo-anovulation (Metwally, Li, and Ledger 2007), the increase of spontaneous miscarriage rates (Rittenberg *et al.* 2011) and ART failure (Maheshwari, Stofberg and Bhattacharya 2007; Fedorcsák *et al.* 2004). It was also described that obesity decreased the chances of spontaneous pregnancy for patients with regular cycles (Van der Steeg *et al.* 2008). On the other hand, very few studies were conducted on the impact of the BMI's increase on OR markers. A study performed on a group of infertile women found an AFC's decrease that was only significant for the right ovary. In that study, there was no AMH levels measurement (Malhotra *et al.* 2013). In our study, we observed a tendency toward an AFC and AMH's decrease when the BMI increased for patients recently proven fertile. Overweight and obesity are well-known infertility factors and would seem to be responsible for an OR decrease, even though we couldn't prove it in our study.

Concerning the OR in spontaneous fertility, when using the Bologna criteria normally used in ART to predict poor responders (Ferraretti *et al.* 2011), we found 4 patients with an AFC lower than 5 (3.4%) and a median age of 41.5 years [39 – 42]; 8 patients with an AFC lower than 7 (6.9%) and a median age of 37.5 years [28 – 42]. For the AMH, we found 4 patients with a level lower than 0.5 (3.4%) and a median age of 41.5 years [39 – 42] and 10 patients (8.6%) with an AMH level lower than 1.1 and a median age of 33.5 years [22 – 42]. Overall, we found that 3 to 9% of our population exhibited ovarian reserve markers described as poor prognosis markers according to the Bologna criteria, but that represented a minority in our cohort, and as for tobacco, their presence could be biased by the fact that we recruited patients from a recently fertile population. Could the quantitative aspect of the OR, already used to predict the response to an IVF follicular stimulation, have a prognosis value in terms of spontaneous fertility?

Our study's limitations were mainly linked to the number of patients. If the 20 – 24 years-old and 25 – 29 years-old subgroups seemed sufficient in size, the other age groups were less represented. This didn't prevent us from finding a significant decrease of the AFC and AMH associated with the age increase, but this age/AFC or age/AMH association appeared of a moderate intensity only. A stronger association might have been found if the numbers were more important for the age groups above 35 years old. Furthermore, we observed a decrease of the AFC and AMH associated with the BMI increase, but this decrease was not significant, possibly because of the insufficient numbers of overweight

and obese patients. We can also mention a limitation in the measurement of the AFC and AMH. Indeed, it is recommended to measure them at day 3 (Broekmans *et al.* 2010), but that was not possible in our study. We tried to minimize this impact when setting our exclusion criteria. Finally, our study was conducted on patients recently fertile; the results cannot be extrapolated on infertile populations but can nonetheless be used as standards for a better interpretation of the AFC and AMH levels.

Conclusion

We established the AFC values in regard to a measurement of the AMH levels by age group in a population recently fertile. In agreement with the literature, the AFC and AMH values significantly decreased when the age increased, and this diminution appeared to be linear in our study. A strong association between AFC and AMH was found. In our study, no significant link could be revealed between tobacco, weight and our OR markers. In contrast, we observed a tendency toward an AFC and AMH decrease when the BMI increased. Finally, we can underline a great variability in results, whether for the AFC or the AMH levels, in the same age groups.

Authors' roles

S.R played a role in the conception, design and acquisition of data ; the interpretation of data ; drafting the article ; the final approval of the version published. I.F took part in the conception, design of data ; interpretation of data ; drafting the article ; the final approval of the version published. P.F played a role in acquisition of data ; the interpretation of data ; drafting the article ; the critical revision of the draft for important intellectual content, the final approval of the version published. P.S was involved in the analyse and interpretation of data ; revising the draft critically for important intellectual content, the final approval of the version published. V.I contributed to the conception of the study. A.B made contributions to the conception and design of the study ; the critical revision of the draft of important intellectual content ; the final approval of the version to be published.

Bibliography

- Adena, M. A., and H. G. Gallagher. Cigarette Smoking and the Age at Menopause. *Hum Biology* 1982;**9**: 121–30.
- Bancsi, László F. J. M. M., Frank J. M. Broekmans, Marinus J. C. Eijkemans, Frank H. de Jong, J. Dik F. Habbema, and Egbert R. te Velde. Predictors of Poor Ovarian Response in in Vitro Fertilization: A Prospective Study Comparing Basal Markers of Ovarian Reserve. *Fertil Steril* 2002;**77**: 328–36.
- Barbakadze, Ludmila, Jenara Kristesashvili, Natalia Khonelidze, and Gia Tsagareishvili. The Correlations of Anti-Müllerian Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Antral Follicle Count in Different Age Groups of Infertile Women. *J Fertil Steril* 2015;**8**: 393–98.
- Broekmans, Frank J. M., Dominique de Ziegler, Colin M. Howles, Alain Gougeon, Geoffrey Trew, and Francois Olivennes. The Antral Follicle Count: Practical Recommendations for Better Standardization. *Fertil Steril* 2010;**94**: 1044–51.
- Curtis, K. M., D. A. Savitz, and T. E. Arbuckle. Effects of Cigarette Smoking, Caffeine Consumption, and Alcohol Intake on Fecundability. *J Epidemiol* 1997;**146**: 32–41.
- Dechanet, C., T. Anahory, J. C. Mathieu Daude, X. Quantin, L. Reyftmann, S. Hamamah, B. Hedon, and H. Dechaud. Effects of Cigarette Smoking on Reproduction. *Hum Reprod* 2011;**17**: 76–95.
- Dewailly, D., H. Gronier, E. Poncelet, G. Robin, M. Leroy, P. Pigny, A. Duhamel, and S. Catteau-Jonard. Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): Revisiting the Threshold Values of Follicle Count on Ultrasound and of the Serum AMH Level for the Definition of Polycystic Ovaries. *Hum Reprod* 2011;**26**: 3123–29.
- Ebner, T., M. Sommergruber, M. Moser, O. Shebl, E. Schreier-Lechner, and G. Tews. Basal Level of Anti-Müllerian Hormone Is Associated with Oocyte Quality in Stimulated Cycles. *Hum Reprod* 2006;**21**: 2022–26.
- Eldar-Geva, Talia, Avraham Ben-Chetrit, Irving M. Spitz, Ron Rabinowitz, Einat Markowitz, Tzvia Mimoni, Michael Gal, Edit Zylber-Haran, and Ehud J. Margalioth. Dynamic Assays of Inhibin B, Anti-Müllerian Hormone and Estradiol Following FSH Stimulation and Ovarian Ultrasonography as Predictors of IVF Outcome. *Hum Reprod* 2005;**20**: 3178–83.
- Fedorcsák, Péter, Per Olav Dale, Ritsa Storeng, Gudvor Ertzeid, Sverre Bjercke, Nan Oldereid, Anne K. Omland, Thomas Abyholm, and Tom Tanbo. Impact of Overweight and Underweight on Assisted Reproduction Treatment. *Hum Reprod* 2004;**19**: 2523–28.
- Ferraretti, A. P., A. La Marca, B. C. J. M. Fauser, B. Tarlatzis, G. Nargund, L. Gianaroli, and ESHRE working group on Poor Ovarian Response Definition. ESHRE Consensus on the Definition of 'Poor Response' to Ovarian Stimulation for in Vitro Fertilization: The Bologna Criteria. *Hum Reprod* 2011;**26**: 1616–24.
- Freour, Thomas, Damien Masson, Lionel Dessolle, Dalila Allaoua, Thomas Dejoie, Sophie Mirallie, Miguel Jean, and Paul Barriere. Ovarian Reserve and in Vitro Fertilization Cycles Outcome according to Women Smoking Status and Stimulation Regimen. *Gynecol Obst* 2012;**285**: 1177–82.
- Haadsma, M. L., A. Bukman, H. Groen, E. M. A. Roeloffzen, E. R. Groenewoud, M. J. Heineman, and A. Hoek. The Number of Small Antral Follicles (2-6 Mm) Determines the Outcome of Endocrine Ovarian Reserve Tests in a Subfertile Population. *Hum Reprod* 2007;**22**: 1925–31.
- Hansen, Karl R., Jamie L. Morris, Angela C. Thyer, and Michael R. Soules. Reproductive Aging and Variability in the Ovarian Antral Follicle Count: Application in the Clinical Setting. *Fertil and Steril* 2003;**80**: 577–83.
- Hehenkamp, Wouter J. K., Caspar W. N. Looman, Axel P. N. Themmen, Frank H. de Jong, E. R. Te Velde, and Frank J. M. Broekmans. Anti-Müllerian Hormone Levels in the Spontaneous Menstrual Cycle Do Not Show Substantial Fluctuation. *Endocrinol Metabol* 2006;**91**: 4057–63.
- Jayaprakasan, K., K. F. Walker, J. S. Clewes, I. R. Johnson, and N. J. Raine-Fenning. The Interobserver Reliability of off-Line Antral Follicle Counts Made from Stored Three-Dimensional Ultrasound Data: A Comparative Study of Different Measurement Techniques. *Ultrasound Obst Gynecol* 2007;**29**: 335–41.
- Kerr, Jeffrey B., Michelle Myers, and Richard A. Anderson. The Dynamics of the Primordial Follicle Reserve. *Reproduction* 2013;**146**: 205–15.
- Kwee, Janet, Mariet E. Elting, Roel Schats, Joseph McDonnell, and Cornelis B. Lambalk. Ovarian Volume and Antral Follicle Count for the Prediction of Low and Hyper Responders with in Vitro Fertilization. *Reprod Biology Endocrinol* 2007;**9**: 7827-5-9.
- Kwee, Janet, Roel Schats, Joseph McDonnell, Axel Themmen, Frank de Jong, and Cornelis Lambalk. Evaluation of Anti-Müllerian Hormone as a Test for the Prediction of Ovarian Reserve. *Fertil and Steril* 2008;**90**: 737–43.
- La Marca, A., S. Giulini, R. Orvieto, V. De Leo, and A. Volpe. Anti-Müllerian Hormone Concentrations in Maternal Serum during Pregnancy. *Hum Reprod* 2005;**20**: 1569–72.
- La Marca, Antonio, Vincenzo De Leo, Simone Giulini, Raoul Orvieto, Stefania Malmusi, Luca Giannella, and Annibale Volpe. Anti-Müllerian Hormone in Premenopausal Women and after Spontaneous or Surgically Induced Menopause. *J Gynecol Investigation* 2005;**12**: 545–48.
- La Marca, Antonio, Elena Spada, Giovanna Sighinolfi, Cindy Argento, Alessandra Tirelli, Simone Giulini, Silvano Milani, and Annibale Volpe. Age-Specific Nomogram for the Decline in Antral

- Follicle Count throughout the Reproductive Period. *Fertil Steril* 2011;**95**: 684–88.
- La Marca, A., G. Sighinolfi, S. Giulini, M. Traglia, C. Argento, C. Sala, C. Masciullo, A. Volpe, and D. Toniolo. Normal Serum Concentrations of Anti-Müllerian Hormone in Women with Regular Menstrual Cycles. *Reprod Biomed Online* 2010;**21**: 463–69.
- Long, W. Q., V. Ranchin, P. Pautier, C. Belville, P. Denizot, H. Cailla, C. Lhommé, J. Y. Picard, J. M. Bidart, and R. Rey. Detection of Minimal Levels of Serum Anti-Müllerian Hormone during Follow-up of Patients with Ovarian Granulosa Cell Tumor by Means of a Highly Sensitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Clinical Endocrinol Metab* 2000;**85**: 540–44.
- Maheshwari, A., Lawrize Stofberg, and S. Bhattacharya. Effect of Overweight and Obesity on Assisted Reproductive Technology--a Systematic Review. *Hum Reprod* 2007;**13**: 433–44.
- Malhotra, Neena, Anupama Bahadur, Neeta Singh, Mani Kalaivani, and Suneeta Mittal. Does Obesity Compromise Ovarian Reserve Markers? A Clinician's Perspective. *A Gynecol Obst* 2013;**287**: 161–66.
- Massé, V., P. Ferrari, I. Boucoiran, J. Delotte, V. Isnard, and A. Bongain. Normal Serum Concentrations of Anti-Müllerian Hormone in a Population of Fertile Women in Their First Trimester of Pregnancy. *Hum Reprod* 2011;**26**: 3431–36.
- Metwally, M., T. C. Li, and W. L. Ledger. The Impact of Obesity on Female Reproductive Function. *Obesity Reviews* 2007; **8**: 515–23.
- Midgette, A. S., and J. A. Baron. Cigarette Smoking and the Risk of Natural Menopause. *Epidemiology* 1990;**1**: 474–80.
- Nelson, Scott M., Frances Stewart, Richard Fleming, and Dilys J. Freeman. Longitudinal Assessment of Antimüllerian Hormone during Pregnancy Relationship with Maternal Adiposity, Insulin, and Adiponectin. *Fertil Steril* 2010;**93**: 1356–58.
- Plante, Beth J., Glinda S. Cooper, Donna D. Baird, and Anne Z. Steiner. The Impact of Smoking on Antimüllerian Hormone Levels in Women Aged 38 to 50 Years. *Menopause* 2010;**17**: 571–76.
- Rittenberg, Vivian, Srividya Seshadri, Sesh K. Sunkara, Sviatlana Sobaleva, Eugene Oteng-Ntim, and Tarek El-Toukhy. Effect of Body Mass Index on IVF Treatment Outcome: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Reprod Biomed Online* 2011;**23**: 421–39.
- Rosen, Mitchell P., Barbara Sternfeld, Sonya M. Schuh-Huerta, Renee A. Reijo Pera, Charles E. McCulloch, and Marcelle I. Cedars. Antral Follicle Count: Absence of Significant Midlife Decline. *Fertil Steril* 2010;**94**: 2182–85.
- Ruess, M. L., J. Kline, R. Santos, B. Levin, and I. Timor-Tritsch. Age and the Ovarian Follicle Pool Assessed with Transvaginal Ultrasonography. *J Obst and Gynecol* 1996;**174**: 624–27.
- Scheffer, G. J., F. J. Broekmans, M. Dorland, J. D. Habbema, C. W. Looman, and E. R. te Velde. Antral Follicle Counts by Transvaginal Ultrasonography Are Related to Age in Women with Proven Natural Fertility. *Fertil Steril* 1999;**72**: 845–51.
- Scheffer, G. J., F. J. M. Broekmans, L. F. Bancsi, J. D. F. Habbema, C. W. N. Looman, and E. R. Te Velde. Quantitative Transvaginal Two- and Three-Dimensional Sonography of the Ovaries: Reproducibility of Antral Follicle Counts. *Ultrasound Obst Gynecol* 2002;**20**: 270–75.
- Scheffer, G. J., F. J. M. Broekmans, C. W. N. Looman, M. Blankenstein, B. C. J. M. Fauser, F. H. teJong, and E. R. teVelde. The Number of Antral Follicles in Normal Women with Proven Fertility Is the Best Reflection of Reproductive Age. *Hum Reprod* 2003;**18**: 700–706.
- Tsepelidis, S., F. Devreker, I. Demeestere, A. Flahaut, Ch Gervy, and Y. Englert. Stable Serum Levels of Anti-Müllerian Hormone during the Menstrual Cycle: A Prospective Study in Normo-Ovulatory Women. *Hum Reprod* 2007;**22**: 1837–40.
- van der Steeg, Jan Willem, Pieter Steures, Marinus J. C. Eijkemans, J. Dik F. Habbema, Peter G. A. Hompes, Jan M. Burggraaff, G. Jur E. Oosterhuis, Patrick M. M. Bossuyt, Fulco van der Veen, and Ben W. J. Mol. Obesity Affects Spontaneous Pregnancy Chances in Subfertile, Ovulatory Women. *Hum Reprod* 2008;**23**: 324–28.
- van Disseldorp, J., M. J. Faddy, A. P. N. Themmen, F. H. de Jong, P. H. M. Peeters, Y. T. van der Schouw, and F. J. M. Broekmans. Relationship of Serum Antimüllerian Hormone Concentration to Age at Menopause. *J Endocrinol Metabol* 2008;**93**: 2129–34.
- van Disseldorp, J., C. B. Lambalk, J. Kwee, C. W. N. Looman, M. J. C. Eijkemans, B. C. Fauser, and F. J. Broekmans. Comparison of Inter- and Intra-Cycle Variability of Anti-Müllerian Hormone and Antral Follicle Counts. *Hum Reprod* 2010;**25**: 221–27.

ANNEXES

Annexe I

Consentement pour recherche scientifique

Madame,

Nous menons actuellement dans le service une recherche sur la fertilité des femmes.

Elle consiste à ajouter le dosage d'une hormone dans la prise de sang obligatoire faite avant votre IVG et de compter le nombre de follicules présents dans chacun de vos ovaires le jour de la consultation de contrôle pendant l'échographie obligatoire. La participation à cette étude ne génère donc aucun examen supplémentaire.

Bien sûr, les données que nous recueillons ont pour but d'améliorer les connaissances scientifiques et votre anonymat sera respecté.

Pour réaliser un tel projet nous avons bien sûr besoin de votre accord que vous pouvez nous donner en signant ce document.

Nous vous remercions par avance de votre aide.

L'équipe du pôle de gynécologie Obstétrique Reproduction.

- OUI, j'accepte le dosage sanguin supplémentaire et sa conservation pour d'éventuelles analyses complémentaires.

Fait le A

Signature

- OUI, j'accepte l'évaluation de ma réserve ovarienne au cours de l'échographie de contrôle.

Fait le A

Signature (précédée de la mention lu et approuvé)

Annexe II

Questionnaire pour recherche scientifique

Nom : **Prénom :** **Age :** Ans

Ethnie : Caucasienne / Africaine / Asiatique

ATCD gonadotoxique :

- professionnel : OUI / NON
- Médical : OUI / NON
- chirurgical : OUI / NON
- traitement : OUI / NON

Tabac : - OUI / NON depuis l'âge de Ans. (..... cig/jour)

G P :

Contraception actuelle : **Débutée le :**

A propos de vos Cycles menstruels :

Vos cycles sont-ils réguliers : OUI / NON

La durée de vos cycles est :

A :	< 26 jours	B :	entre 27 et 35 jours
C :	> 35 jours	D :	nsp (patientes sous pilule)

Pendant la période où vous êtes tombée enceinte :

Aviez-vous une contraception ? OUI / NON **La quelle ?**

D'après vous, cette grossesse est due :

- A : A une absence de contraception et des rapports non protégés.
- B : Une erreur dans la prise de la pilule.
- C : Un oubli de pilule.
- D : Un accident lié à l'utilisation uniquement de préservatifs.
- E : Vous ne savez pas.

Aviez vous des rapports : réguliers / occasionnels

CFA : **AMH :**

Annexe III

Technique de dosage de l'AMH

UltraSensitive AMH/MIS ELISA



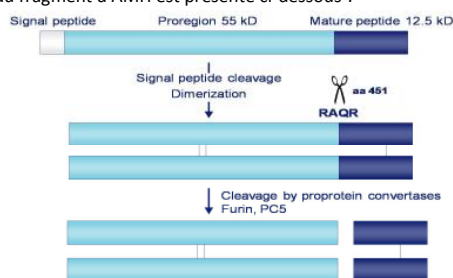
AL-105-i

UTILISATION PREVUE

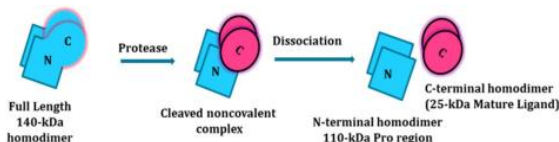
Cette trousse permet un dosage quantitatif de l'hormone anti-müllérienne/substance inhibitrice müllérienne (Anti-Müllerian Hormone/ Mullerian inhibiting substance, AMH/MIS) par la technique ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) dans le sérum, plasma et d'autres liquides biologiques humains. Ce test est prévu exclusivement pour un usage de diagnostic *in vitro*. **Ce dosage n'est pas destiné à prédire la réponse ovarienne dans les protocoles de stimulation folliculaire (Brevet EP 1 1419 239 B1).**

RESUME ET EXPLICATION

L'hormone anti-müllérienne (Anti-Müllerian hormone, AMH), membre de la super-famille des TGF β , est une glycoprotéine homodimère composée de deux homodimères de 55 kDa en N-terminal et deux homodimères de 12,5 kDa en C-terminal, liés de manière non covalente par des ponts disulfures. Le clivage du fragment d'AMH est présenté ci-dessous¹.



Des études récentes montrent que l'homodimère à l'extrémité C-terminale de l'AMH est beaucoup moins actif que le complexe non covalent mais il est possible de rétablir la quasi totalité de l'activité par association avec la pro-région située à l'extrémité N-terminale qui reforme un complexe avec l'homodimère de l'extrémité C-terminale mature. Cette observation laisse penser que le complexe non covalent d'AMH serait la forme active de la protéine. Il a été rapporté que le complexe non covalent d'AMH clivé se lie à l'AMHR_{II} et stimule la réponse intracellulaire, alors que l'AMH de longueur intégrale ne présente qu'une activité minimale.²



L'AMH est sécrétée par les cellules de Sertoli chez l'homme. Au cours du développement embryonnaire, l'AMH est responsable de la régression des canaux de Müller. L'AMH continue à être produite par les testicules jusqu'à la puberté puis diminue lentement pour atteindre des valeurs résiduelles post-puberté. Chez la femme, l'AMH est produite par les cellules de la granulosa des petits follicules en développement, à partir de la 36^{ème} semaine de grossesse et jusqu'à la ménopause, où les concentrations deviennent alors indétectables. L'AMH a des applications cliniques potentielles dans l'insuffisance ovarienne précoce, les tumeurs ovariennes, la ménopause et de nombreuses autres situations.

PRINCIPE DU TEST

La trousse US AMH/MIS ELISA est un test d'immuno-essai quantitatif de type sandwich en trois étapes. Dans la première étape, les calibrateurs, les contrôles et les échantillons inconnus sont ajoutés aux puits de microtitration enduits d'anticorps AMH et sont mis à incuber. Après la première incubation et le premier lavage, les puits sont incubés avec une solution d'anticorps anti-AMH biotinylés. Après la deuxième incubation et le deuxième lavage, les puits sont incubés avec une solution de conjugué de peroxydase de raifort / streptavidine (streptavidin horseradish peroxidase conjugate, SHRP). Après la troisième étape d'incubation et de lavage, les puits sont incubés avec une solution de substrat (TMB) suivie d'une solution d'arrêt acide. En principe, le conjugué anticorps-biotinylé se lie au complexe anticorps-antigène en phase solide qui se lie à son tour au conjugué streptavidine-enzyme. Le complexe conjugué anticorps-antigène-biotine-SHRP lié au puits est détecté par la réaction enzyme-substrat. Le degré de renouvellement enzymatique du substrat est déterminé par la mesure de l'absorbance à double longueur d'onde à 450 nm pour le filtre de test primaire et 630 nm pour le filtre de référence. L'absorbance mesurée est directement proportionnelle à la concentration d'AMH/MIS dans les échantillons et les calibrateurs.

PRODUITS FOURNIS

CAL-105A Calibrateur A / diluant d'échantillon

Un flacon, 11 ml, étiqueté AMH/MIS CAL A/SAMPLE DIL, contenant 0 ng/ml d'AMH dans un tampon à base de protéines et Pro-Clean 400. Stocker non ouvert à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.

CAL-105B - CAL-105F Calibrateurs B à F (lyophilisés)

Cinq tubes, étiquetés CAL B-F, contenant des concentrations d'environ 0,09-15,0 ng/ml d'AMH dans un tampon à base de protéines et Pro-Clean 400. Se reporter à la **carte de calibration** pour les concentrations exactes. Avant ouverture, stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Reconstituer les calibrateurs B-F avec 1 ml d'eau déminéralisée. Solubiliser, bien mélanger et utiliser après reconstitution. Aliquoter et congeler immédiatement en tubes plastique pour une utilisation multiple et jeter après utilisation. Eviter les cycles répétés de congélation-décongélation. La concentration d'AMH/MIS dans les calibrateurs AMH/MIS est établie à partir des étalons de travail du fabricant. Les valeurs établies par d'autres méthodologies peuvent être différentes. Ces différences, si elles existent, peuvent être dues au biais inter-méthodes.

CTR-105-I & CTR-105-II Contrôles I & II (lyophilisés)

Deux tubes, étiquetés CONTROL I et CONTROL II contenant des concentrations faibles et élevées d'AMH dans un tampon à base de protéines et Pro-Clean 400. Se reporter à la **carte de calibration** pour les concentrations exactes. Avant ouverture, stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption. Reconstituer les contrôles I et II avec 1 ml d'eau déminéralisée. Solubiliser, bien mélanger et utiliser après reconstitution. Aliquoter et congeler immédiatement en tubes plastique pour une utilisation multiple et jeter après utilisation. Eviter les cycles répétés de congélation-décongélation.

PLT-105 Barrettes de microtitration enduits d'AMH/MIS

Un portoir de barrettes, contenant 12 barrettes soit 96 puits de microtitration sensibilisés avec des anticorps anti-AMH. Stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption dans le sachet refermable avec un dessiccant pour la protection contre l'humidité.

ASB-205 Tampon de test

Un flacon, 12 ml, étiqueté AMH/MIS ASSAY BUFFER, contenant un tampon à base de protéines (SAB) avec un conservateur sans mercure. Stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.

BCR-105 Conjugué d'AMH biotinylé prêt à l'emploi

Un flacon, 12 ml, étiqueté AMH/MIS BIO CONJ RTU, contenant un anticorps anti-AMH biotinylé dans un tampon à base de protéines avec un conservateur sans mercure. Stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.

SAR-105 Conjugué streptavidine-enzyme prêt à l'emploi

Un flacon de couleur ambre, 12 ml, étiqueté AMH/MIS STREP CONJ RTU, contenant de la streptavidine-HRP (peroxydase de raifort) dans un tampon à base de protéines et un conservateur sans mercure. Stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.

TMB-100 Solution chromogène de TMB

Un flacon, 11 ml, étiqueté TMB SOLN, contenant une solution de tétraméthylbenzidine (TMB) dans un tampon avec du peroxyde d'hydrogène. Stocker à 2-8°C jusqu'à la date de péremption.

STP-100 Solution d'arrêt

Un flacon, 11 ml, étiqueté STOP SOLN, contenant 0,2 M d'acide sulfurique. Stocker à 2-30°C jusqu'à la date de péremption.

WSH-100 Concentré de lavage A

Un flacon, 60 ml, étiqueté WASH CONC A, contenant une solution saline tamponnée avec un détergent non ionique. Stocker à 2-30°C jusqu'à la date de péremption. Diluer 25 fois avec de l'eau déminéralisée avant utilisation.

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

1. Lecteur de plaques de microtitration capable de mesurer l'absorbance à 450 nm, 405 nm et 630 nm.
2. Agitateur orbital de plaques de microtitration.
3. Laveur de plaques de microtitration.
4. Pipette de précision semi-automatisée/manuelle pour prélever 10–250 µl.
5. Vortex.
6. Eau déminéralisée.

MISES EN GARDE ET PRECAUTIONS**Pour un usage de diagnostic *in vitro*.**

Les précautions suivantes doivent être respectées:

- a) respecter les bonnes pratiques de laboratoire.
- b) utiliser des équipements de protection individuelle. Porter des blouses de laboratoire et des gants jetables lors de la manipulation des réactifs et des échantillons.
- c) manipuler et éliminer tous les réactifs et consommables conformément aux réglementations applicables.

ATTENTION : matériel pouvant présenter un risque biologique

Cette trousse peut contenir des substances d'origine humaine (sérum par exemple) ou des substances utilisées en association avec des substances d'origine humaine. Manipuler tous les réactifs et échantillons de patients à un niveau 2 de biosécurité, conformément aux recommandations émises pour les substances d'origine humaine potentiellement infectieuses du

manuel des Centers for Disease Control/National Institutes of Health "Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories" (biosécurité dans les laboratoires microbiologiques et biomédicaux), 5^{ème} édition, 2007³.

ATTENTION : danger chimique potentiel

Certains réactifs de cette trousse contiennent du Pro-Clean 400 et de l'azide de sodium⁴ utilisés comme conservateurs. Le Pro-Clean 400 et l'azide de sodium, en quantités concentrées, sont irritants pour la peau et les muqueuses.

Pour plus d'informations au sujet des substances dangereuses de la trousse, consulter la fiche de sécurité soit sur AnshLabs.com soit en en faisant la demande auprès de votre distributeur local.

COLLECTE ET PREPARATION DES ECHANTILLONS

- a) Les échantillons recommandés sont le sérum et le plasma hépariné.
- b) Les exigences relatives à la manipulation, au traitement et au stockage des échantillons dépendent du type de tube de prélèvement sanguin que vous utilisez. Merci de vous reporter aux instructions du fabricant. Chaque laboratoire doit déterminer l'acceptabilité de ses propres tubes de prélèvement sanguin et produits de séparation du sérum.
- c) Les échantillons peuvent être stockés à 2-8°C si le test est réalisé sous 24 heures ; dans le cas contraire, les échantillons doivent être stockés à -20°C ou -80°C pour éviter toute perte de bioactivité et toute contamination.
- d) Eviter de tester des échantillons lipémiques, hémolysés ou ictériques.
- e) Eviter les cycles répétés de congélation/décongélation des échantillons. Ne pas décongeler les échantillons plus de 3 fois.
- f) Pour le transport, placer les échantillons dans des conteneurs étanches dans des sachets pour échantillons présentant un risque biologique, avec l'identification correcte des échantillons et les informations de demande de test dans la poche extérieure du sachet. Respecter les exigences DOT et IATA pour le transport des échantillons.⁵

REMARQUES RELATIVES AUX PROCEDURES

1. Il est nécessaire de bien comprendre cette notice pour utiliser correctement le test US AMH/MIS ELISA. Il incombe au manipulateur de valider le test pour l'utilisation qu'il prévoit d'en faire. Il n'est possible d'obtenir des résultats précis qu'en utilisant des techniques de laboratoire précises et en appliquant les instructions de la notice.
2. Une courbe d'étalonnage doit être réalisée avec chaque test.
3. Amener tous les réactifs à température ambiante (23 ± 2°C) avant utilisation. Mélanger soigneusement les réactifs avant utilisation en les retournant doucement. Ne pas mélanger différents lots de réactifs et n'utiliser aucun réactif au-delà de sa date de péremption.
4. Utiliser un embout de pipette jetable propre pour chaque réactif, calibrateur, contrôle ou échantillon. Eviter toute contamination microbienne des réactifs et la contamination des solutions de substrat par les conjugués HRP. L'enzyme utilisée comme marqueur est inactivée par l'oxygène et est très sensible à la contamination microbienne, à l'azide de sodium, à l'acide hypochloreux et aux hydrocarbures chlorés aromatiques que l'on trouve souvent dans l'eau des laboratoires. Utiliser de l'eau déminéralisée.
5. Un lavage incomplet a des effets négatifs sur le résultat et la précision du test. Il faut faire attention lors de l'ajout du TMB dans les puits afin de minimiser la dérive potentielle du test due à la variation du temps d'incubation de TMB. Eviter d'exposer les réactifs à une chaleur excessive ou à la lumière.

PREPARATION DES REACTIFS

1. **Calibrateurs B-F et contrôles I & II**: reconstituer les calibrateurs B-F et les contrôles I & II avec 1 ml d'eau déminéralisée chacun. Solubiliser, bien mélanger et utiliser après reconstitution.
2. **Solution de lavage** : diluer au 1/25^e le concentré de lavage A avec de l'eau déminéralisée. La solution de lavage est stable pendant un mois à température ambiante (23 ± 2°C) quand elle est stockée dans un flacon bouché hermétiquement.
3. **Puits de microtitration** : sélectionner le nombre de puits nécessaires pour le test. Les puits inutilisés restants doivent être placés dans le sachet refermable avec un dessiccant. Refermer le sachet de manière étanche pour le protéger de l'humidité.

PROCEDURE DE TEST

Laisser tous les échantillons et réactifs revenir à température ambiante (23 ± 2°C) et les mélanger soigneusement en les agitant doucement par retournement avant utilisation. Les calibrateurs, les contrôles et les échantillons inconnus doivent être testés en double.

REMARQUE : tous les échantillons de sérum dont la valeur lue est supérieure au calibrateur le plus élevé doivent être mélangés et dilués dans le calibrateur A/diluant d'échantillon 0 ng/ml (**CAL A/SAMPLE DIL**) avant le test.

1. Reconstituer les calibrateurs B-F (**CAL B-F**) et contrôles I & II (**CONTROL I & CONTROL II**) avec 1 ml d'eau déminéralisée chacun. Solubiliser pendant **10 minutes** puis mélanger à l'aide d'un vortex à faible vitesse (agitation douce).
2. Etiqueter les barrettes de microtitration à utiliser.
3. Déposer **25 µl** de chaque calibrateur, contrôle et échantillon dans les puits correspondants.
4. Ajouter **100 µl** de tampon de test (**ASSAY BUFFER**) dans chaque puits à l'aide d'une pipette à distribution répétitive.
5. Incuber la plaque, en agitant à **600-800 tr/min** sur un agitateur orbital de plaques de microtitration, pendant **90 minutes** à température ambiante (23 ± 2°C).
6. Aspirer et laver chaque barrette **5 fois** avec **350 µl/puits** de solution de lavage à l'aide d'un laveur automatique de plaques de microtitration.
7. Ajouter **100 µl** de conjugué anticorps-biotinylé (**BIO CONJ RTU**) dans chaque puits à l'aide d'une pipette à distribution répétitive.
8. Incuber la plaque, en agitant à **600-800 tr/min** sur un agitateur orbital de plaques de microtitration, pendant **30 minutes** à température ambiante (23 ± 2°C).
9. Aspirer et laver chaque barrette **5 fois** avec **350 µl/puits** de solution de lavage à l'aide d'un laveur automatique de plaques de microtitration.
10. Ajouter **100 µl** de conjugué streptavidine-enzyme (**STREP CONJ RTU**) dans chaque puits à l'aide d'une pipette à distribution répétitive.
11. Incuber la plaque, en agitant à **600-800 tr/min** sur un agitateur orbital de plaques de microtitration, pendant **30 minutes** à température ambiante (23 ± 2°C).
12. Aspirer et laver chaque barrette **5 fois** avec **350 µl/puits** de solution de lavage à l'aide d'un laveur automatique de plaques de microtitration.
13. Ajouter **100 µl** de la solution chromogène de TMB (**TMB-SOLN**) dans chaque puits à l'aide d'une pipette à distribution répétitive. Eviter l'exposition directe à la lumière.
14. Incuber les puits, en agitant à **600-800 tr/min** sur un agitateur orbital de plaques de microtitration, pendant **8-12 min** à température ambiante (23 ± 2°C).

REMARQUE : surveiller visuellement la coloration pour optimiser le temps d'incubation.

15. Ajouter **100 µl** de la solution d'arrêt (**STOP SOLN**) dans chaque puits à l'aide d'une pipette à distribution répétitive. Lire l'absorbance de la

solution dans les puits dans les **20 minutes**, à l'aide d'un lecteur de plaques de microtitration réglé sur **450 nm**.

REMARQUE : Le calibrateur Zéro doit être programmé comme « **Blanc** » pour la lecture des densités optiques. Si votre lecteur est équipé d'une lecture à double longueur d'onde, réglez le **filtre de test** sur **450 nm** et le **filtre de référence** sur **630 nm**.

RESULTATS

REMARQUE : les résultats de cette notice ont été calculés par tracé des données sur une échelle log-log (Log DO sur l'axe des y et Log concentration AMH sur l'axe des x) avec un ajustement de courbe de régression cubique. Il est également possible d'utiliser un ajustement de courbe log-log de régression quadratique. Les autres méthodes de réduction des données peuvent donner des résultats légèrement différents.

1. Les résultats optimaux sont obtenus avec une température d'incubation de **23 ± 2°C**.
2. Calculer la densité optique moyenne (DO) pour chaque calibrateur, contrôle ou échantillon.
3. Tracer la courbe d'étalonnage comme suit : le logarithme des valeurs de densité optique moyenne de chaque calibrateur sur l'axe y en fonction du logarithme des concentrations d'AMH/MIS, en ng/ml, sur l'axe x, puis tracer la courbe de régression cubique.
4. Déterminer les concentrations d'AMH/MIS des contrôles et des échantillons à l'aide de la courbe d'étalonnage en associant leurs valeurs de densité optique moyenne aux concentrations d'AMH/MIS correspondantes.
5. Chaque échantillon dont la valeur lue est supérieure au calibrateur le plus élevé doit être correctement dilué avec le **CAL A/SAMPLE DIL** et retesté.
6. Chaque échantillon dont la valeur lue est inférieure à la sensibilité analytique doit être consigné comme tel.
7. Multiplier la valeur par un facteur de dilution, si besoin est.

LIMITES

Les réactifs fournis dans cette trousse sont optimisés pour mesurer les concentrations d'AMH/MIS dans le sérum humain et le plasma hépariné. En cas de signe de contamination microbienne ou de trouble excessif dans un réactif, jeter le tube. Pour les tests utilisant des anticorps, il existe une possibilité d'interférences dues à la présence d'anticorps hétérophiles dans les échantillons⁵.

CONTROLE QUALITE

- Chaque laboratoire doit fixer des valeurs moyennes et des plages acceptables pour garantir un fonctionnement correct.
- Les contrôles AMH/MIS ELISA et autres contrôles du commerce doivent se situer dans les limites de confiance définies.
- Les limites de confiance pour les contrôles AMH/MIS sont imprimées sur la **carte de calibration**.
- Une courbe d'étalonnage complète, avec les contrôles de bas et de haut niveau, doit être incluse dans chaque test.
- Le TMB doit être incolore. L'apparition d'une couleur peut indiquer une contamination ou une instabilité du réactif.

DONNEES DE COURBE D'ETALONNAGE REPRESENTATIVE

Numéro de puits	Contenu du puits	Absorbance moyenne	Conc (ng/ml)
A1, A2	Calibrateurs		
	A	0,04 (blanc)	0
B1, B2	B	0,04	0,08
C1, C2	C	0,09	0,30
D1, D2	D	0,31	1,03
E1, E2	E	1,07	3,96
F1, F2	F	2,86	14,2

CARACTERISTIQUES ANALYTIQUES

Toutes les caractéristiques analytiques sont exprimées en ng/ml (1 ng/ml = 7,14 pMol/l)

Limite de détection (LoD) :

La quantité minimale d'AMH/MIS détectable dans un échantillon avec une probabilité de 95 % (n=24) est 0,023 ng/ml. Cette valeur a été établie en testant cinq échantillons de sérum dans la plage 0,03 à 0,346 ng/ml suivant les recommandations du CLSI EP17. Douze séries de tests ont été réalisées sur deux jours, en testant les échantillons en double dans chaque série.

Limite de quantification (LoQ) :

La dose minimale estimée obtenue à une imprécision totale de 20 % est de 0,06 ng/ml. Cette valeur a été établie en testant huit échantillons dans la plage 0,03 à 2,85 ng/ml sur douze séries et sur deux jours en duplicat (n=24) suivant les recommandations du CLSI EP17.

Imprécision :

La reproductibilité du test US AMH/MIS ELISA a été établie dans une étude utilisant trois mélanges de sérums. Cette étude a comporté un total de 12 tests, à raison de quatre réplicats par test (n=48). Les données représentatives ont été calculées sur la base des principes directeurs du NCCLS EP5-A et sont présentées dans le tableau suivant.

Echantillon	Conc. moyenne	Intra-essai		Inter-essai		Total	
	(ng/ml)	Ecart-type	%CV	Ecart-type	%CV	Ecart-type	%CV
Pool-1	0,35	0,01	1,97%	0,02	4,63%	0,02	5,13%
Pool-2	0,72	0,03	3,66%	0,03	4,79%	0,04	6,03%
Pool-3	1,85	0,07	4,00%	0,04	1,98%	0,08	4,46%

Linéarité :

Sur la base du NCCLS EP-6-P, des dilutions multiples des trois échantillons de sérum contenant différentes concentrations d'AMH/MIS ont été diluées avec le calibrateur A/diluant d'échantillon. Le % de récupération sur les différents échantillons est représenté dans le tableau suivant.

Echantillon	Facteur de dilution	Conc. attendue(ng/ml)	Conc. observée (ng/ml)	% Récupération
1	Net	7,39	Net	Sans objet
	1:2	3,69	3,85	104 %
	1:4	1,85	1,87	101 %
	1:8	0,92	0,94	102 %
	1:16	0,46	0,46	99 %
2	Net	4,44	Net	Sans objet
	1:2	2,22	2,26	102 %
	1:4	1,11	1,20	108 %
	1:8	0,56	0,61	109 %
	1:16	0,28	0,29	105 %
3	Net	7,11	Net	Sans objet
	1:2	3,55	3,89	109 %
	1:4	1,78	1,90	107 %
	1:8	0,89	0,99	111 %
	1:16	0,44	0,48	107 %

Récupération :

Des quantités connues d'AMH/MIS ont été ajoutées à trois échantillons de sérum contenant différentes concentrations d'AMH/MIS endogène. La concentration d'AMH/MIS a été établie avant et après l'ajout d'AMH/MIS exogène et le pourcentage de récupération a été calculé.

Echantillon	Conc. Endogène (ng/ml)	Conc. attendue (ng/ml)	Conc. observée (ng/ml)	% Récupération
1	1,56	1,92	1,78	93 %
		2,27	2,18	96 %
		2,63	2,52	96 %
2	1,13	1,51	1,42	94 %
		1,89	1,69	89 %
		2,27	1,96	86 %
3	1,20	1,58	1,41	89 %
		1,95	1,78	91 %
		2,33	2,11	91 %

Spécificité analytique :

La paire d'anticorps monoclonaux utilisée dans le test détecte l'AMH/MIS humaine et ne provoque pas de réaction croisée avec les autres espèces (bovine, équine, ovine, canine, rat et souris).

Substance testée	Concentration	% de réactivité croisée
Inhibine A	100 ng/ml	ND
Inhibine B	100 ng/ml	ND
Activine A	50 ng/ml	ND
Activine B	50 ng/ml	ND
Activine AB	50 ng/ml	ND
Dimère AMH de longueur totale	1000 ng/ml	100
rAMH	130 ng/ml	ND
AMH mature	120 ng/ml	1,33
hAMH(Pro)	300 ng/ml	0,23
ProMature hAMH	110 ng/ml	100

Interférences :

Quand des substances interférentes potentielles (hémoglobine, triglycérides et bilirubine) ont été ajoutées au double de leur concentration physiologique dans l'échantillon contrôle, la concentration d'AMH/MIS se situait dans une plage de $\pm 10\%$ du contrôle, comme indiqué dans le tableau suivant. Cette étude reposait sur le NCCLS EP7-P avec ajout de matrice sérique.

Substance interférente	Conc. de l'analyte (mg/ml)	Valeur de l'échantillon non additionné (ng/ml)	Valeur de l'échantillon additionné (ng/ml)	% Différence
Hémoglobine	1,35	6,15	6,21	1,01
		4,67	4,62	-0,88
Triglycérides	5	6,15	6,33	2,98
		4,67	4,51	-3,37
Bilirubine	0,60	4,86	4,80	-1,23
		3,11	3,08	-0,77

Valeurs attendues :

Ces échantillons ont été analysés à l'aide des trousses Ultra-Sensitive AMH/MIS ELISA et AnshLite™ US AMH/MIS CLIA. Les plages attendues pour AMH/MIS ont été calculées sur des échantillons de sérum à l'aide d'une estimation non paramétrique à 90-95 % utilisant Analyse-It® pour Microsoft Excel.

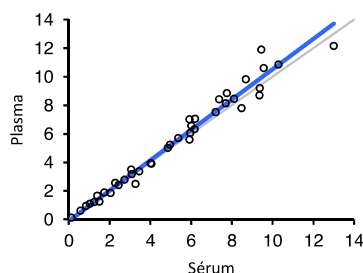
Type d'échantillon	Nombre d'échantillons	Age médian	Conc. Médiane (ng/ml)	Plage AMH (ng/ml)
Féminin < 8 semaines	33	3 sem	0.00	<0.02 – 0.49
Féminin < 10 ans	23	5 ans	1.69	0.05 – 10.40
Féminin 11-20 ans	35	17 ans	3.25	0.62 – 11
Féminin 21-30 ans	33	26 ans	3.78	< 0.02 – 10.39
Féminin 31-40 ans	56	35 ans	2.39	0.14 – 10.40
Féminin 41-50 ans	79	44 ans	0.42	<0.02 – 6.35
Féminin > 51 ans	94	59 ans	0.00	<0.02 – 0.39
Masculin < 3 mois	52	5 jours	83.39	24.22 – 275.46
Masculin 1-11 ans	45	7 ans	122.40	38.25 – 332.40
Masculin 12-20 ans	23	14 ans	6.47	1.12 – 143.64
Masculin > 20 ans	83	47 ans	4.90	0.59 – 17.71

Remarque : il est recommandé que chaque laboratoire détermine la(les) plage(s) de référence pour sa propre population de patients. Les résultats de ce test doivent être utilisés en association avec d'autres informations cliniques pertinentes et applicables.

Type d'échantillons :

Quarante échantillons appariés de sérum et de plasma hépariné, dans la plage 0,13-13,01 ng/ml, ont été comparés avec le test US AMH/MIS ELISA. L'analyse de Passing et Bablok des résultats a donné la régression suivante :

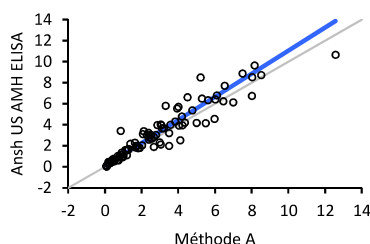
plasma=1,06 (sérum)-0,10, (r=0,995 ; P<0,0001)



Comparaison des méthodes :

Le test UltraSensitive AMH/MIS ELISA a été comparé à un test AMH du commerce (méthode A) avec 90 échantillons de sérum dans la plage 0,1-12,58 ng/ml. L'analyse de Passing et Bablok des résultats a donné la régression suivante :

UltraSensitive AMH/MIS ELISA (AL-105) = 1,10 (méthode A) + 0,06
(r=0,98; P<0,0001)



REFERENCES

1. Pepinski, R.B., et al. (1988) J. Biol. Chem., 263, 18961-18964.
2. di Clemente et al. Mol Endocrinol, November 2010, 24 (11): 2193-2206.
3. HHS Publication, 5th ed., 2007. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Disponible sur <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/BMBL5>
4. DHHS (NIOSH) Publication No. 78-127, August 1976. Current Intelligence Bulletin 13 - Explosive Azide Hazard. Available <http://www.cdc.gov/niosh>.
5. Approved Guideline – Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens, H18-A3. 2004. Clinical and Laboratory Standards Institute.
6. Kricka L. Interferences in immunoassays – still a threat. Clin Chem 2000; 46: 1037–1038.

Le logo Ansh Labs est une marque déposée d'Ansh Labs.



Fabriqué par :

Ansh Labs

445 Medical Center Blvd.

Webster, TX 77598-4217, U.S.A.



RD-RatioDiagnostics GmbH
Westerbachstr.47
60489 Frankfurt, Allemagne

Distribué en France par :

FUMOUEZ DIAGNOSTICS
110 -114 Rue Victor Hugo
92686 Levallois-Perret Cedex
www.fumouze.com



Ansh Labs consumables are being shipped with English Instructions for Use (IFUs). You may contact your local Ansh Labs sales representative or technical support organization to obtain translated IFUs.

Les consommables Ansh Labs sont livrés avec des instructions d'utilisation en anglais. N'hésitez pas à contacter votre société d'assistance technique ou votre représentant Ansh Labs local pour obtenir des instructions traduites.

Die Verbrauchsmaterialien von Ansh Labs werden mit englischer Gebrauchsanweisung (IFU) geliefert. Wenden Sie sich gegebenenfalls an Ihren zuständigen Vertreter von Ansh Labs oder den technischen Kundendienst, um übersetzte Gebrauchsanweisungen zu erhalten.

Los consumibles para Ansh Labs se entregan con las instrucciones de uso (IFU) en inglés. También puede ponerse en contacto con el representante local de ventas de Ansh Labs o con la empresa de asistencia técnica para obtener las IFU traducidas.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Zamboni L.** Fine morphology of the follicle wall and follicle cell-oocyte association. *Biol Reprod.* 1974 Mar;10(2):125–49.
2. **Forabosco A, Sforza C.** Establishment of ovarian reserve: a quantitative morphometric study of the developing human ovary. *Fertil Steril.* 2007 Sep 1;88(3):675–83.
3. **Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA.** A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2008 Mar;23(3):699–708.
4. **Williams CJ, Erickson GF.** Morphology and Physiology of the Ovary. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, et al., editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [cited 2015 Aug 23]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>
5. **Haadsma ML, Bukman A, Groen H, Roeloffzen EMA, Groenewoud ER, Heineman MJ, et al.** The number of small antral follicles (2-6 mm) determines the outcome of endocrine ovarian reserve tests in a subfertile population. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2007 Jul;22(7):1925–31.
6. **Ferté-Delbende C, Catteau-Jonard S, Barrière P, Dewailly D.** [Evaluation of the ovarian reserve]. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod.* 2010 Dec;39(8 Suppl 2):S27–33.
7. **Sowers MR, Zheng H, McConnell D, Nan B, Harlow S, Randolph JF.** Follicle stimulating hormone and its rate of change in defining menopause transition stages. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):3958–64.
8. **Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Broekmans FJ, et al.** Predictive value and clinical impact of Basal follicle-stimulating hormone in subfertile, ovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jun;92(6):2163–8.
9. **Lambalk CB, de Koning CH.** Interpretation of elevated FSH in the regular menstrual cycle. *Maturitas.* 1998 Oct 12;30(2):215–20.
10. **Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB.** A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update.* 2006 Dec;12(6):685–718.
11. **De Vet A, Laven JSE, de Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM.** Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril.* 2002 Feb;77(2):357–62.

12. **Scheffer GJ, Broekmans FJ, Dorland M, Habbema JD, Looman CW, Velde ER te.** Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril.* 1999 Nov;72(5):845–51.
13. **Jayaprakasan K, Deb S, Batcha M, Hopkisson J, Johnson I, Campbell B, et al.** The cohort of antral follicles measuring 2-6 mm reflects the quantitative status of ovarian reserve as assessed by serum levels of anti-Müllerian hormone and response to controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril.* 2010 Oct;94(5):1775–81.
14. **Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Eijkemans MJC, de Jong FH, Habbema JDF, Velde ER te.** Predictors of poor ovarian response in in vitro fertilization: a prospective study comparing basal markers of ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2002 Feb;77(2):328–36.
15. **Barbakadze L, Kristesashvili J, Khonelidze N, Tsagareishvili G.** The correlations of anti-mullerian hormone, follicle-stimulating hormone and antral follicle count in different age groups of infertile women. *Int J Fertil Steril.* 2015 Mar;8(4):393–8.
16. **Scheffer GJ, Broekmans FJM, Looman CWN, Blankenstein M, Fauser BCJM, teJong FH, et al.** The number of antral follicles in normal women with proven fertility is the best reflection of reproductive age. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2003 Apr;18(4):700–6.
17. **La Marca A, Spada E, Sighinolfi G, Argento C, Tirelli A, Giulini S, et al.** Age-specific nomogram for the decline in antral follicle count throughout the reproductive period. *Fertil Steril.* 2011 Feb;95(2):684–8.
18. **Broekmans FJM, de Ziegler D, Howles CM, Gougeon A, Trew G, Olivennes F.** The antral follicle count: practical recommendations for better standardization. *Fertil Steril.* 2010 Aug;94(3):1044–51.
19. **Klinkert ER, Broekmans FJM, Looman CWN, Habbema JDF, Velde ER te.** The antral follicle count is a better marker than basal follicle-stimulating hormone for the selection of older patients with acceptable pregnancy prospects after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2005 Mar;83(3):811–4.
20. **Hendriks DJ, Mol B-WJ, Bancsi LFJMM, Velde ER Te, Broekmans FJM.** Antral follicle count in the prediction of poor ovarian response and pregnancy after in vitro fertilization: a meta-analysis and comparison with basal follicle-stimulating hormone level. *Fertil Steril.* 2005 Feb;83(2):291–301.
21. **Van Disseldorp J, Lambalk CB, Kwee J, Looman CWN, Eijkemans MJC, Fauser BC, et al.** Comparison of inter- and intra-cycle variability of anti-Mullerian hormone and antral follicle counts. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2010 Jan;25(1):221–7.

22. **Bancsi LFJMM, Broekmans FJM, Looman CWN, Habbema JDF, Velde ER te.** Impact of repeated antral follicle counts on the prediction of poor ovarian response in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2004 Jan;81(1):35–41.
23. **Hansen KR, Morris JL, Thyer AC, Soules MR.** Reproductive aging and variability in the ovarian antral follicle count: application in the clinical setting. *Fertil Steril.* 2003 Sep;80(3):577–83.
24. **Scheffer GJ, Broekmans FJM, Bancsi LF, Habbema JDF, Looman CWN, Velde ER Te.** Quantitative transvaginal two- and three-dimensional sonography of the ovaries: reproducibility of antral follicle counts. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2002 Sep;20(3):270–5.
25. **Jayaprakasan K, Walker KF, Clewes JS, Johnson IR, Raine-Fenning NJ.** The interobserver reliability of off-line antral follicle counts made from stored three-dimensional ultrasound data: a comparative study of different measurement techniques. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007 Mar;29(3):335–41.
26. **Visser JA, Themmen APN.** Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2005 Apr 29;234(1-2):81–6.
27. **La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS.** ESHRE Special Interest Group for Reproductive Endocrinology AMH Round Table. Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know? *Hum Reprod Oxf Engl.* 2009 Sep;24(9):2264–75.
28. **Long WQ, Ranchin V, Pautier P, Belville C, Denizot P, Cailla H, et al.** Detection of minimal levels of serum anti-Müllerian hormone during follow-up of patients with ovarian granulosa cell tumor by means of a highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Feb;85(2):540–4.
29. **Su HI.** Measuring ovarian function in young cancer survivors. *Minerva Endocrinol.* 2010 Dec;35(4):259–70.
30. **Ebner T, Sommergruber M, Moser M, Shebl O, Schreier-Lechner E, Tews G.** Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2006 Aug;21(8):2022–6.
31. **Van Disseldorp J, Faddy MJ, Themmen APN, de Jong FH, Peeters PHM, van der Schouw YT, et al.** Relationship of serum antimüllerian hormone concentration to age at menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jun;93(6):2129–34.
32. **Reichman DE, Goldschlag D, Rosenwaks Z.** Value of antimüllerian hormone as a prognostic indicator of in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2014 Apr;101(4):1012–8.e1.

33. **Van Rooij IAJ, Broekmans FJM, Scheffer GJ, Looman CWN, Habbema JDF, de Jong FH, et al.** Serum antimüllerian hormone levels best reflect the reproductive decline with age in normal women with proven fertility: a longitudinal study. *Fertil Steril*. 2005 Apr;83(4):979–87.
34. **Hehenkamp WJK, Looman CWN, Themmen APN, de Jong FH, Velde ER Te, Broekmans FJM.** Anti-Müllerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4057–63.
35. **Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y.** Stable serum levels of anti-Müllerian hormone during the menstrual cycle: a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2007 Jul;22(7):1837–40.
36. **Massé V, Ferrari P, Boucoiran I, Delotte J, Isnard V, Bongain A.** Normal serum concentrations of anti-Müllerian hormone in a population of fertile women in their first trimester of pregnancy. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2011 Dec;26(12):3431–6.
37. **Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M, et al.** Anti-Müllerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Oct;27(10):3085–91.
38. **Fréour T, Mirallié S, Bach-Ngohou K, Denis M, Barrière P, Masson D.** Measurement of serum anti-Müllerian hormone by Beckman Coulter ELISA and DSL ELISA: comparison and relevance in assisted reproduction technology (ART). *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 2007 Jan;375(1-2):162–4.
39. **Su HI, Sammel MD, Homer MV, Bui K, Haunschild C, Stanczyk FZ.** Comparability of antimüllerian hormone levels among commercially available immunoassays. *Fertil Steril*. 2014 Jun;101(6):1766–72.e1.
40. **La Marca A, De Leo V, Giulini S, Orvieto R, Malmusi S, Giannella L, et al.** Anti-Müllerian hormone in premenopausal women and after spontaneous or surgically induced menopause. *J Soc Gynecol Investig*. 2005 Oct;12(7):545-88
41. **La Marca A, Sighinolfi G, Giulini S, Traglia M, Argento C, Sala C, et al.** Normal serum concentrations of anti-Müllerian hormone in women with regular menstrual cycles. *Reprod Biomed Online*. 2010 Oct;21(4):463–9.
42. **La Marca A, Giulini S, Orvieto R, De Leo V, Volpe A.** Anti-Müllerian hormone concentrations in maternal serum during pregnancy. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2005 Jun;20(6):1569–72.
43. **Nelson SM, Stewart F, Fleming R, Freeman DJ.** Longitudinal assessment of antimüllerian hormone during pregnancy-relationship with maternal adiposity, insulin, and adiponectin. *Fertil Steril*. 2010 Mar 1;93(4):1356–8.

44. **Ruess ML, Kline J, Santos R, Levin B, Timor-Tritsch I.** Age and the ovarian follicle pool assessed with transvaginal ultrasonography. *Am J Obstet Gynecol.* 1996 Feb;174(2):624-7.
45. **Rosen MP, Sternfeld B, Schuh-Huerta SM, Reijo Pera RA, McCulloch CE, Cedars MI.** Antral follicle count: absence of significant midlife decline. *Fertil Steril.* 2010 Nov;94(6):2182-5.
46. **Dewailly D, Gronier H, Poncelet E, Robin G, Leroy M, Pigny P, et al.** Diagnosis of polycystic ovary syndrome (PCOS): revisiting the threshold values of follicle count on ultrasound and of the serum AMH level for the definition of polycystic ovaries. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011 Nov;26(11):3123-9.
47. **Midgette AS, Baron JA.** Cigarette smoking and the risk of natural menopause. *Epidemiol Camb Mass.* 1990 Nov;1(6):474-80.
48. **Adena MA, Gallagher HG.** Cigarette smoking and the age at menopause. *Ann Hum Biol.* 1982 Apr;9(2):121-30.
49. **Dechanet C, Anahory T, Mathieu Daude JC, Quantin X, Reyftmann L, Hamamah S, et al.** Effects of cigarette smoking on reproduction. *Hum Reprod Update.* 2011 Feb;17(1):76-95.
50. **Curtis KM, Savitz DA, Arbuckle TE.** Effects of cigarette smoking, caffeine consumption, and alcohol intake on fecundability. *Am J Epidemiol.* 1997 Jul 1;146(1):32-41.
51. **Freour T, Masson D, Dessolle L, Allaoua D, Dejoie T, Mirallie S, et al.** Ovarian reserve and in vitro fertilization cycles outcome according to women smoking status and stimulation regimen. *Arch Gynecol Obstet.* 2012 Apr;285(4):1177-82.
52. **Plante BJ, Cooper GS, Baird DD, Steiner AZ.** The impact of smoking on antimüllerian hormone levels in women aged 38 to 50 years. *Menopause N Y N.* 2010 Jun;17(3):571-6.
53. **Metwally M, Li TC, Ledger WL.** The impact of obesity on female reproductive function. *Obes Rev Off J Int Assoc Study Obes.* 2007 Nov;8(6):515-23.
54. **Rittenberg V, Seshadri S, Sunkara SK, Sobaleva S, Oteng-Ntim E, El-Toukhy T.** Effect of body mass index on IVF treatment outcome: an updated systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 2011 Oct;23(4):421-39.
55. **Maheshwari A, Stofberg L, Bhattacharya S.** Effect of overweight and obesity on assisted reproductive technology--a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2007 Oct;13(5):433-44.

56. **Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S, Oldereid N, et al.** Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2004 Nov;19(11):2523–8.
57. **Van der Steeg JW, Steures P, Eijkemans MJC, Habbema JDF, Hompes PGA, Burggraaff JM, et al.** Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2008 Feb;23(2):324–8.
58. **Malhotra N, Bahadur A, Singh N, Kalaivani M, Mittal S.** Does obesity compromise ovarian reserve markers? A clinician's perspective. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Jan;287(1):161–6.
59. **Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BCJM, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al.** ESHRE consensus on the definition of “poor response” to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2011 Jul;26(7):1616–24.

SERMENT D' HIPPOCRATE

Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque.